R. UNIVERSITÀ DI PISA

ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
R. OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

127

O. VERONA E G. LUCHETTI

RICERCHE MICROBIOLOGICHE SU DI ALCUNI VINI ED ALCUNE UVE DELLE MARCHE.

Estratto dal *Bollettino del R. Istit. Sup. Agrario di Pisa*
Volume XII - 1936 - XV.

PREMIATO STABILIMENTO TIPOGRAFICO G. CURSI & FIGLI - 1936 XV

R. UNIVERSITÀ DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE
E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
R. OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

O. VERONA E G. LUCHETTI

RICERCHE MICROBIOLOGICHE SU DI ALCUNI VINI ED ALCUNE UVE DELLE MARCHE.

Estratto dal *Bollettino del R. Istit. Sup. Agrario di Pisa*
Volume XII - 1936 - XV.

PREMIATO STABILIMENTO TIPOGRAFICO G. CURSI & FIGLI - 1936 XV

O. VERONA e G. LUCHETTI

RICERCHE MICROBIOLOGICHE SU DI ALCUNI VINI ED ALCUNE UVE DELLE MARCHE.

RIASSUNTO: *Gli Aa. hanno studiato dal punto di vista sistematico numerosi ceppi di lieviti sporigeni e asporigeni isolati da uve e da vini delle Marche.*

Altresì hanno stabilito di ogni singolo ceppo la resistenza alle varie temperature e fissata la tollerabilità di fronte all'alcool ed all'ac. tartarico.

Infine, hanno ripreso a studiare il tema relativo all'associazione di più specie e più razze nella fermentazione.

SOMMARIO

1 - Premessa
2 - Origine dei ceppi
3 - I lieviti sporigeni
a) gli ellittici
b) gli apiculati: la questione delle spore
c) altri lieviti sporigeni
4 - I lieviti asporigeni
a) non filamentosi
b) filamentosi
5 - Resistenza alle varie temperature
6 - Tollerabilità di fronte all' alcool ed all' ac. tartarico
7 - Associazione di più specie e più razze nella fermentazione
8 - Conclusioni.

1 - Premessa.

I lieviti della fermentazione vinaria sono stati studiati fin oggi separatamente, mai comparativamente e mai, sopratutto, sono state eseguite indagini sul-

la microbiologia delle uve e di vini coltivate o ottenuti in una determinata regione. Solo di recente e mentre il presente lavoro era in corso di elaborazione è apparso un lungo studio di G. De Rossi ([1]) sui lieviti della fermentazione vinaria nella regione umbra.

Questo lavoro, nel quale si prendono in considerazione 87 mosti e 379 stipiti, avvalora l' importanza di siffatte indagini, mentre riveste ai nostri fini particolare interesse, data la contiguità delle due regioni prese in considerazione.

Tali studi saranno da noi ripresi e nella prossima campagna sarà indagata la microbiologia delle uve e dei vini toscani con particolare riguardo al «Chianti» e ai vini delle zone limitrofe.

Per lo studio dei diversi ceppi isolati ci siamo valsi delle norme in uso (che sarebbe superfluo qui di ripetere) limitando il rilievo dei caratteri – dato il numero non trascurabile dei ceppi – a quelli aventi valore diagnostico ([2]).

A termine dei reperti speciologici sono state eseguite alcune ricerche particolari soffermandoci sopratutto sul rendimento alcoolico di mosti fermentati con specie o ceppi diversi in associazione funzionale onde sviluppare un concetto già precedentemente espresso ([3])-([4]) e meritevole, per l' importanza teorica e pratica, di estensione e di conferma.

2 – Origine dei ceppi.

Tutti i diversi lieviti qui descritti furono isolati, con il metodo delle colture a piatto allestite con agar-mosto reso meno acido per aggiunte di KOH, nei pressi di Macerata da uno di noi (Luchetti) durante l' ottobre 1934. In parte essi provengono da uve, in parte da vini; in ogni caso fu tenuto conto del grado alcoolico dei liquidi di provenienza delle diverse specie isolate.

Lieviti isolati da uve.

Biancone, nome locale (Albana bianca, Albana gentile, Balsamina bianca, Greco, ecc.)

Prelevato il campione il 2-X-1934

Vinificata il 6-X-1934

eseguite colture d' isolamento il 12-X-1934
grado alcoolico del mosto dopo 16 g. di vinificazione 9.5
Isolati i ceppi n. 8-9-10.

Gacciò, n. l. (= Pagadebiti [68], Fermano, Passerino, Carricante, ecc.)
Prelevato il campione il 2-X-1934
Vinificata il 6-X-1934
eseguite colture d' isolamento il 12-X-1934
grado alcoolico del mosto dopo 16 g. di vinificazione 6.50
Isolati i ceppi n. 11 - 12A - 12B.

Chiapparò, n. l. (Montonico bianco [58], Chiapparone, Montanicino, ecc.)
Prelevato il campione il 5-X-1934
Vinificata il 6-X-1934
eseguite colture d' isolamento il 12-X-1934
grado alcoolico del mosto dopo 16 giorni di vinificazione 10.1
Isolati i ceppi n. 13 - 14A - 14B.

Peccecò curtu, n. l. (non se ne conosce altra nomenclatura)
Prelevato il campione il 2-X-1934
Vinificata il 6-X-1934
eseguite colture d' isolamento il 12-X-1934
grado alcoolico del mosto dopo 16 g. di vinificazione 8.25
Isolati i ceppi n. 16 - 17 - 18.

Malvasia.
Prelevato il campione il 2-X-1934.
Vinificata il 6-X-1934.
eseguite colture d' isolamento il 12-X-1934
grado alcoolico del mosto dopo 16 g. di vinificazione 11,5.
Isolati i ceppi n. 19 - 20 - 21A - 21B - 22.

Moscatello.
Prelevato il campione il 30-IX-34.
Vinificata il 6-X-1934
eseguite colture d' isolamento il 12-X-1934
grado alcoolico del mosto dopo 16 g. di vinificazione 12,25.

Isolati i ceppi n. 34 - 35 - 36.

Picurì, n. l. (= Pecorino, sec. nomenclatura Cavazza).

Prelevato il campione il 2-X-1934.

Vinificata il 6-X-1934

eseguite colture d' isolamento il 16-X-1934

grado alcoolico del mosto dopo 16 g. di vinificazione 6,75.

Isolati i ceppi n. 37 - 39 - 50.

Santa Maria, n. l. (nomenclatura ignota).

Prelevato il campione il 4-X-1934.

Vinificata il 6-X-1934

eseguite colture d' isolamento il 16-X-1934

grado alcoolico del mosto dopo 16 g. di vinificazione 11,75.

Isolati i ceppi n. 42 - 43.

Trebbiano.

Prelevato il campione il 4-X-1934.

Vinificata il 6-X-1934

eseguite colture d' isolamento il 17-X-1934.

grado alcoolico del mosto dopo 16 g. di vinificazione 9,10.

Isolati i ceppi n. 44 - 45 - 46 - 47.

Verdicchio, n. l. (= Verdicchio bianco, Verdea, ecc.).

Prelevato il campione il 2-X-1934.

Vinificata il 6-X-1934

eseguite colture d' isolamento il 16-X-1934

grado alcoolico del mosto dopo 16 g. di vinificazione 10,6.

Isolati i ceppi n. 48 - 49 - 50 - 51.

Una grana, n. l. (nomenclatura ignota).

Prelevato il campione il 2-X-1934.

Vinificata il 6-X-1934

eseguite colture d' isolamento il 17-X-1934

grado alcoolico del mosto dopo 16 g. di vinificazione 11,5.

Isolati i ceppi n. 52 - 53 - 54.

Barzamina, n. l. (= Balsamina nera, Vernaccina, Pavana, ecc.).
Prelevato il campione il 2-X-1934.
Vinificata il 6-X-1934
eseguite colture d' isolamento il 17-X-1934
grado alcoolico del mosto dopo 16 g. di vinificazione 10,85.
Isolati i ceppi n. 55 - 56 - 57 - 58.

Bordeaux.
Prelevato il campione il 2-X-1934.
Vinificata il 6-X-1934
eseguite colture d' isolamento il 17-X-1934
grado alcoolico del mosto dopo 16 g. di vinificazione 14.
Isolati i ceppi n. 59 - 60 - 61.

Brugnintì, n. l. (= Morgentina, Vernaccia nera, Brugnentino, ecc.).
Prelevato il campione il 2-X-1934
Vinificata il 6-X-1934
eseguite colture d' isolamento il 17-X-1934
grado alcoolico del mosto dopo 16 g. di vinificazione 10.
Isolati i ceppi n. 62 - 64.

Duracino, n. l. (Uva da tavola, nomenclatura ignota)
Prelevato il campione il 2-X-1934
Vinificata il 6-X-1934
eseguite colture d' isolamento il 17-X-1934
grado alcoolico del mosto dopo 16 g. di vinificazione 9.
Isolati i ceppi n. 65 - 66 - 67.

Cimiciara, n. l. (u. nera americana. Sec. Cavazza = Isabella, Fragola; Ottav
e Marescalchi: Vitis Lambrusca).
Prelevato il campione il 2-X-1934.
Vinificata il 6-X-1934
eseguite colture d' isolamento il 17-X-1934
grado alcoolico del mosto dopo 16 g. di vinificazione 7,2.
Isolati i ceppi n. 68 - 69 - 70.

Montepulciano.

Prelevato il campione il 2-X-1934

Vinificata il 6-X-1934

eseguite colture d' isolamento il 17-X-1934

grado alcoolico del mosto dopo 16 g. di vinificazione 12,5

Isolati i ceppi n. 71 - 72 - 73.

Moscatello (= Moscato nero, Moscatello rosso, ecc.).

Prelevato il campione il 30-IX-1934

Vinificato il 6-X-1934

eseguite colture d' isolamento il 17-X-1934

grado alcoolico del mosto dopo 16 g. di vinificazione 11,75

Isolati i ceppi n. 23 - 74 - 75.

Sangiovese.

Prelevato il campione il 2-X-1934

Vinificato il 6-X-1934

eseguite colture d' isolamento il 17-X-1934

grado alcoolico del mosto dopo 16 g. di vinificazione 8,75

Isolati i ceppi n. 76 - 77.

Tintoria (= Fogarina nera, Uva di Gualtieri, Tintoria, ecc., sec. nom. Cavazza).

Prelevato il campione il 2-X-1934

Vinificata il 6-X-1934

eseguite colture d' isolamento il 17-X-1934

grado alcoolico del mosto dopo 16 g. di vinificazione 10,8

Isolati i ceppi n. 78 - 79.

Tokay.

Prelevato il campione il 4-X-1934

Vinificata il 6-X-1934

eseguite colture d' isolamento il 16-X-1934

grado alcoolico del mosto dopo 16 g. di vinificazione 12,25

Isolati i ceppi n. 80 - 81 - 82.

LIEVITI ISOLATI DA VINI.

Vino cotto 1919.

Vinificazione di un miscuglio di u. bianche
eseguite colt. d' isolamento il 15-IX-1934
tenore alcoolico del vino 14,85
Isolato il ceppo n. 7.

Vino cotto 1933.

Vinificazione di un miscuglio di u. bianche
eseguite colt. d' isolamento il 16-IX-1934
tenore alcoolico del vino 14,30
Isolati i ceppi n. 27 - 28 - 29.

Vino cotto 1934.

Vinificazione di un miscuglio di u. bianche
eseguite colture d' isolamento il 15-X-1934
tenore alcoolico del vino 12,25
Isolati i ceppi n. 30 - 31.

Vino bianco 1933.

Vinificazione di un miscuglio di u. bianche
eseguite colture d' isolamento il 5-X-1934
tenore alcoolico del vino 9,75
Isolati i ceppi n. 1 - 3.

Vino bianco 1934.

Vinificazione c. s.
eseguite colture d' isolamento il 16-X-1934
tenore alcoolico del vino 9,75
Isolati i ceppi n. 24A - 24B - 25 - 26.

Vino rosso 1933.

Vinificazione di un miscuglio di u. rosse
eseguite colt. d' isolamento il 22-IX-1934
tenore alcoolico del vino 11,25
Isolati i ceppi n. 4 - 5 - 6.

Vino rosso 1934.

Vinificazione c. s.

eseguite colt. d' isolamento il 23-X-1934

tenore alcoolico del vino 10,2

Isolati i ceppi n. 32 – 33.

3. – I lieviti sporigeni.

a) Gli ellittici.

La maggior parte dei ceppi isolati, sia da uve che da vino, sono riferibili a *Sacch. ellipsoideus* Hansen o, come propone la Stellin Dekker, a *Sacch. cerevisiae* var. *ellipsoideus* (Hansen) Dekker.

Ne collimano i caratteri d' insieme e le lievi differenze registrate nei vari ceppi rientrano nelle variazioni di razza se non individuali. Le accenniamo appena incominciando con il rilevare, per quanto ha riferimento alla struttura protoplasmatica, che, mentre in genere il contenuto cellulare è ricco di granulazioni od anche di vacuoli, in alcuni stipiti esso si presenta, invece, specialmente in malto e, da principio, anche negli agar, piuttosto omogeneo e vacuolizzato (fig. 1).

Fig. 1 – *Il contenuto protoplasmatico di* Sacch. ellipsoideus Hansen *in genere granuloso o guttulato a volte appare omogeneo e più o meno vacuolizzato.*

Il processo di sporulazione si compie secondo le modalità note e v' è appena da rilevare, a conferma di altre osservazioni, come gli aschi si formino più o meno facilmente anche nei comuni agar, particolarmente su agar-fagiuoli e specie verso la parte alta del tubo qualora si tratti di agar solidificato in posizione inclinata. Le spore sono sempre rotonde, liscie, di $\mu + 3$ di diametro, generalmente con una goccia oleosa. La forma degli aschi è varia e anche vario, pur sempre mantenendosi entro i limiti di 1-4, è il numero delle spore per asco. Per quanto si riferisce a quest' ultimo fatto v' è tuttavia da rilevare che, se il tipo più comune, per numero di spore e forma di asco, è quello figurato in *B* di fig. 2 si hanno casi in cui

più o meno, ci se ne discosta. Così, per esempio, nei ceppi n. 25 e 79 il numero delle spore per asco sembra essere costantemente o almeno con fortissima prevalenza limitato a due, fatto che richiama alla mente la var. *umbra* di *Sacch.*

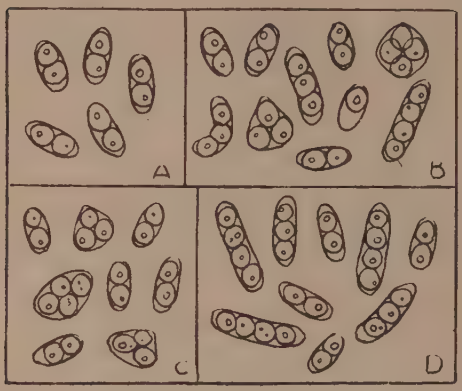

Fig. 2 – *Varie forme di aschi in* Sacch. ellipsoideus Hansen.

Fig. 3 – *Infissione in gelatina.* (La fig. si riferisce al ceppo n.81)

Fig. 4 – *Varie forme di col. giganti di* Sacch. ellipsoideus Hansen *isolato da uve e da vini delle Marche.*

ellipsoideus, recentemente descritta da CASTELLI ([6]) *A)*, di fig. 2). Altre volte (*C*, di fig. 2) su di una grande percentuale di aschi bisporei se ne rinvengono alcuni

con tre o molto raramente con quattro spore; oppure e infine, si ha prevalenza (*D*, fig. 2) di aschi tetraspori dove le spore sono disposte linearmente.

Nulla da segnalare per quanto si riferisce al comportamento in gelatina che non viene fluidificata e dove lo sviluppo si osserva sia in superficie che, leggero, lungo il fittone. Circa le colonie giganti è noto come esse si presentino di forma e configurazione diverse a seconda dei ceppi. La fig. 4 ne illustra qualcuna, e sarà superfluo insistere su questo e appena bastevole l'avvertire come il tipo più comune sia quello (riferendosi alla figura) dei ceppi n. 33-34-73-55-51-20.

Un' ultimo rilievo è diretto all'attività fermentativa e specialmente avuto riguardo alla fermentazione del mannosio. Cioè: mentre i nostri ceppi hanno sempre, indistintamente, fermentato destrosio, levulosio, saccarosio, galattosio, maltosio e, molto più debolmente, raffinosio, non sempre si sono dimostrati capaci di fermentare il mannosio. Ciò non infirma il riferimento sistematico dei diversi stipiti ed avremmo potuto anche omettere tale osservazione. Tuttavia abbiamo voluto sottolinearla per il fatto che, dalle monografie della STELLING-DEKKER ([5]) e della LODDER ([7]), non risulterebbe che esistano lieviti incapaci di fermentare il mannosio una volta che fermentino destrosio e levulosio. Nella nostra pratica, sia pur modesta, questo invece si verificherebbe e non solo in lieviti sporigeni ma anche in lieviti non sporigeni (*). Del resto non sono pochi gli Aa. che hanno descritto specie fermentanti glucosio, levulosio e non mannosio.

Il fatto ci è sembrato opportuno di doverlo segnalare perchè possa essere ulteriormente indagato.

b) GLI APICULATI: LA QUESTIONE DELLE SPORE.

Ceppi n.: 9 da uva « Biancone »
17 » » « Peccecò curtu ».

Malto. Al 3° g. a 24° C. liquido torbo; al fondo deposito, in superficie

(*) – Le prove di fermentazione furono eseguite sia con i tubi di Linhorm (Smith) che con le provette Durham.

sottile anello, tracce di velo, sviluppo di bollicine gassose. Con il tempo il liquido si fa più torbo, per poi schiarire, e il deposito più abbondante.

Cellule ovali, naviculari o limoniformi con plasma omogeneo, presente o non vacuolo, gemmanti, di μ (2.4 – 3.3) × (4.95 – 6.6).

Agar-malto. Patina continua, bianchiccia, opaca, non mucilaginosa, ad orlo continuo o leggermente frastagliato. (In agar fagiuoli sviluppo più limitato di patina semi-trasparente).

Dopo 24ʰ a 24° C. cellule con plasma omogeneo da ovali a naviculari a limoniformi, gemmanti, di μ 3.3 × 6.6 – 13.2. In vecchie colture la forma si mantiene costante; dimensioni: μ (2.4–3,3) × (6.6 – 11.5).

Colonia gigante (su agar-malto dopo 20 g. a 24° C.): circolare, bianchiccia, piatta, priva di particolari strutture.

Gelatina: non fluidifica.

Latte: rimane invariato.

Formazione di spore: Difficilmente, come si verifica per l'ellittico od altri sporigeni, si formano spore nei comuni agar. Un po' più facilmente al momento dell'isolamento o anche previ passaggi in agar-malto e su agar-lavato e agar-Gorodkowa. Gli aschi difficilmente mantengono l'aspetto limoniforme, e più facile è rinvenirne di ovali. Ogni asco contiene una spora rotonda o leggermente angolosa di μ 2.4 – 3 circa.

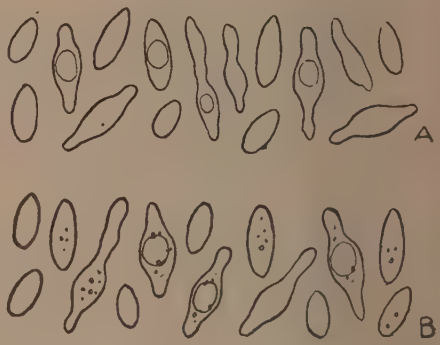

Fig. 5 – *Ceppo n. 9* – in *A* in malto al 3° g.; in *B* in agar-malto.

Fig. 6 – *Cellule sporificate del ceppo n. 9.*

Fermentazione degli zuccheri

xilosio	—	saccarosio	—
arabinosio	—	galattosio	—
destrosio	+	maltosio	+
levulosio	+	lattosio	—
mannosio	+	raffinosio	—

Assimilazione delle sostanze azotate

peptone	+	KNO_2	—
asparagina	—	KNO_3	—
urea	—	$(NH_4)_2 SO_4$	—

Sviluppo in presenza di alcool etilico

scarso

Posizione sistematica. Nel quadro dei lieviti sporigeni questi ceppi rientrano per il complesso dei loro caratteri entro il Gen. *Kloeckeraspora* di NIEHAUS e verosimilmente sono riferibili a *Kloeck. uvarum* NIEHAUS.

La dibattuta questione relativa alla formazione di spore da parte dei lieviti di forma apiculata poteva dirsi, almeno in parte, risolta in seguito ai lavori di KLOECKER, PŸPER, KUFFERATH, LODDER e, sopratutto NIEHAUS, confermanti le osservazioni, più antiche, di BEŸERINCK, LINDNER, ZIKES e per i quali molti ceppi di lieviti limoniformi appaiono essere sporigeni (*) se non fosse stata risollevata recentemente da CASTELLI ([8]). Questo Autore, riprendendo la tecnica di NIEHAUS ([9]), non è riuscito ad osservare come lo stesso NIEHAUS ha osservato la germinazione di ciò che i precedenti Aa. e sopratutto NIEHAUS ritengono essere spore. Perciò, in base anche a prove di termoresistenza tra forme ammesse come sporificate e forme non sporificate, conclude per negare valore di spora

(*) – Per una breve rassegna relativa alla posizione sistematica degli apiculati sporigeni rimandiamo a quanto uno di noi ebbe occasione di descrivere in un precedente lavoro (confr. O. VERONA e M. VALLEGGI, l. c.).

Riassumendo, i lieviti sporigeni di forma apiculata o altrimenti limoniformi sono compresi nei tre generi seguenti:

Hanseniaspora ZIKES (con spore rotonde o a cappello da 2 a 4 per asco)
— *Valbyensis* KLOECKER
— *Guilliermondii* PŸPER
— *Melligerii* LODDER
Kloeckeraspora NIEHAUS (con spore rotonde 1-2 per asco)
— *uvarum* NIEHAUS
— *osmophila* NIEHAUS
Nadsonia SIDOW
— *elongatu* KONOKOTINE
— *fulvescens* (NADSON et KONOKOTINE) SIDOW
— *Richteri* KOSTKA.

al corpo o ai corpi globosi formantisi con il tempo e secondo determinate condizioni nelle cellule apiculate. Nel negare questo, pur riconoscendo che *tali corpi globosi si colorano come le spore dei blastomiceti*, non indica che cosa, secondo lui, anche in via di ipotesi, potrebbero essi rappresentare.

La questione, presentandosi l' occasione, è stata da noi di nuovo esaminata e, pur confermandosi in parte i referti sperimentali di CASTELLI, non ci sentiamo di condividere in pieno le sue negative conclusioni.

Per quanto si riferisce alla germinazione delle spore abbiamo operato coltivando in goccia pendente una cellula sporificata. Seguendo la tecnica dell'isolamento monocitogenetico non è difficile, con materiale di partenza convenientemente diluito e dopo qualche tentativo, di provvedersi di preparati contenenti nella goccia una sola cellula. Abbiamo usato mosto d' uva e coltivato a 25° C.. Le prove furono più volte ripetute e i risultati conseguiti non furono invero molto espressivi in quanto sei volte, su dieci, il corpo globoso sembrò non procedere ad alcuna evoluzione anche trascorse 24 ore. Ma in quattro preparati i fatti decorsero nella maniera fissata da NIEHAUS e cioè si ebbe assorbimento della parete ascale e germinazione della spora da cui si originò una cellula ovoide : l' ulteriore evoluzione e gemmazione di questa porta a cellule limoniformi.

Per quanto si riferisce alla termoresistenza delle cellule sporificate i risultati ci hanno confermato, in massima, i reperti di CASTELLI.

Una dimostrazione esauriente della germinabilità delle spore presunte o ritenute, manca adunque non ottenendosi in tutti i casi : inoltre non è dimostrata per le colture sporificate nessuna decisa proprietà termoresistente in confronto di colture non sporificate come invece verificasi per la generalità dei lieviti sporigeni. Tuttavia, i reperti *positivi* pur ottenuti, anche se non costantemente, ci autorizzano od affermare che al corpo globoso rinvenibile entro le cellule limoniformi di alcuni lieviti e che si colora come le spore di blastomiceti si possa attribuire il valore di spora. Il fatto di constatare con qualche difficoltà la sua germinazione deve, secondo noi, ricercarsi in una molto attenuata, forse

presto perdentesi, facoltà germinativa come del resto si attenua e si perde, in tali lieviti, la capacità sporigena (*).

c) Altri lieviti sporigeni.

Ceppo n° 6 da vino rosso 1933.

Malto. Al 3° g. a 24° C. liquido quasi limpido; non anello, non velo, scarso deposito al fondo. Al 30° g. liquido omogeneamente torbo. Cellule tondeggianti con grossa goccia oleosa di μ 4.9 – 5.2 di diametro.

Agar-malto. Patina abbondante, di rapida crescita, bianca, opaca, umida, poltacea.

Dopo 24 h. a 24° C. cellule tondeggianti o ovali, gemmanti, isolate o abbinate di μ 4.9 – 5.2 di diametro con alcune più grandi fino a μ 8.2. Al 15° g. cellule rotonde di μ 4.9 – 5.2 o leggermente ovoidi con grossa goccia oleosa. Al 30° g. in molte cellule compaiono appendici tubuliformi più o meno lunghe.

Colonia gigante (su agar-malto al 20° g. a 24° C.). Grande circa cm. 1,5, bianca, subrotonda, poltacea, piatta, non crateriforme, priva di particolari rilievi.

Gelatina. Sviluppo in superficie ed anche, sebbene scarso, lungo il fittone. Al 60° g. non fluidificazione ma semplice affossamento.

Latte: rimane invariato.

Formazione di spore. Sporificazione tarda. Aschi partenogenetici trisporei oppure aschi formantisi in seguito a processi pseudocopulativi con 1–2 spore liscie, rotonde, di μ +2.4–2.3.

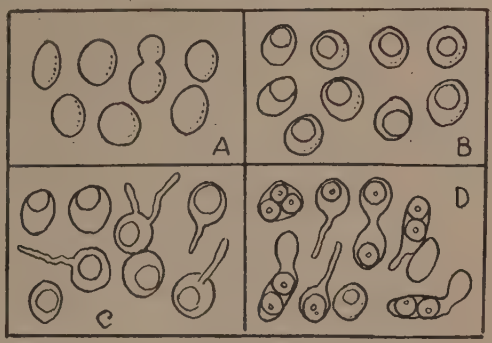

Fig. 7 – *Torulaspora Rosei* Guilliermond. *A*, *B*, *C*, cellule vegetative in agar-malto dopo 24 h, 15 g. e 30 g.; *D*, cellule sporificate.

(*) – Questa interpretazione crediamo che si possa accettare anche alla stregua di quanto è noto in biologia generale. Sappiamo pure, ad es., che esistono semi in cui l'embrione perde con facilità il suo potere germinativo. Orbene, in questi casi nessuno riconosce nel seme non germinante o nell'embrione qualche cosa di diverso da quello che effettivamente rappresenta!

Fermentazione degli zuccheri

	Gas	Acido
xilosio	—	—
arabinosio	—	—
destrosio	+	+
Cevulosio	+	+
mannosio	+	+
saccarosio	+	+
galattosio	—	+
maltosio	—	+
lattosio	—	—
raffinosio	+	+
mannite	—	—
inulina	—	—

Assimilazione delle sostanze azotate

peptone	+
asparagina	+
urea	±
KNO_2	—
KNO_3	—
$(NH_4)_2 SO_4$	±

Sviluppo in presenza di alcool etilico.

Stentato, non abbondante.

Posizione sistematica.

I caratteri di questa specie collimano perfettamente (salvo la fluidificazione della gelatina, essendosi verificato solo rammollimento) con quelli di *Torulaspora Rosei* Guilliermond con la quale si identifica.

Questa specie fu isolata la prima volta dalle secrezioni mucose di alcune Quercie e recentemente da mosti umbri (De' Rossi-Castelli, lav. citati).

Ceppo n. 58: da uva "Barzamina".

Malto. Liquido poco torbo con sedimento. Cellule ovali germinanti a un polo obliquamente di μ 4.9 × 6.6 – 8.2.

Agar-malto. Patina abbondante, continua, poltacea, bianca, opaca, umida. Cellule ovoidi fino a lungamente ovoidi, ellittiche od anche a volte piriformi con granuli o vacuoli. Misurano μ 4.95 × 8,25 — 11.5; difficilmente se ne rinvengono di più grandi dimensioni.

Colonia gigante su agar-fagiuoli dopo 20 g. a 24° C. grande poco meno di 2 cm., bianca, poltacea, circolare, piatta con insenature radiali ai margini che si presentano lobati.

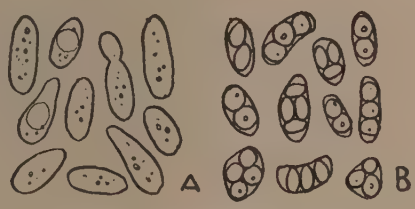

Fig. 8 – *Sacch. Mangini* GUILLIERMOND *A*, cellule in agar-malto; *B*, c. sporificate.

Gelatina. Sviluppo in superficie e lungo il fittone; non fluidificazione al 45°g.

Latte. Rimane invariato.

Formazione di spore: facilmente formansi spore anche negli agar. Sono contenute 1-4 (più frequentemente 2) per asco; sono liscie, rotonde, od anche ovali di μ ± 3 di diametro le prime, μ ± 2.4 – 2.8 × 3.3 le seconde.

Fig. 9 – *Sacch. Mangini* GUILL col. gigante (gr. nat.)

Fermentazione degli zuccheri:

xilosio	—	galattosio	+
arabinosio	—	maltosio	—
destrosio	+	lattosio	—
levulosio	+	raffinosio	+
mannosio	+	mannite	—
saccarosio	+	inulina	—

Assimilazione dei nitrati: negativa.

Sviluppo in presenza di alcool etilico: mediocre.

Riferimento sistematico:

Per i caratteri fissati questa specie rientra in *Sacch. Mangini* GUILLIERMOND. C'è solo da notare la presenza talvolta di spore ovali anzichè costantemente rotonde o emisferiche.

Ceppi n. 4 : da vino rosso 1933.
65 : da uva " Duracino ".
30 : da vino cotto 1934.
46 : da uva Trebbiano.

Malto. Al 20° g. a 24° C. liquido torbo, velo sottile e anello, deposito al fondo. Non bollicine gassose, non modificazioni del mezzo colturale. Tali caratteri si mantengono salvo un maggior intorbidamento del liquido seguito da parziale chiarificazione ed un maggiore ispessimento del velo.

Vegetazioni costituite da cellule ovali o lungamente ovali, in parte vacuolizzate, gemmanti per una o più gemme, di μ (2.4 – 3.3) × (4.4 – 12.8). Con l'invecchiamento le dimensioni si fanno un pò più omogenee aggirandosi in media intorno ai μ 3.3 × 6.6 – 8.8.

Agar-malto. Patina continua, bianca, opaca, non lucida, con orlo leggermente lobato. (In agar-fagiuoli sviluppo più limitato di esile patina semitrasparente).

Dopo 24 h. vegetazione costituita da cellule ovali o lungamente ovali, con vacuolo, attivamente gemmanti per una o più gemme, di μ 3.2 × 4.8 od anche di μ 4.8 × 6.4, fino a (μ 3.2–4.9) × (6.6 – 12.8) accompagnate da un rudimentale apparato pseudo-micelico costituito da pseudoifi di μ (1.6 – 3.2) × (6.4 – 16). Le cellule, gemmando, rimangono unite generalmente a formare corte catene.

Fig. 10 – *Pichia membranaefaciens* HANSEN *A*, diversi aspetti in agar-malto; *B*, cellule sporificate

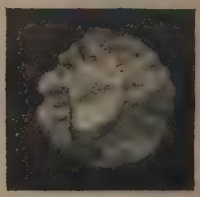

Fig. 11 – *Pichia membranaefaciens* HANSEN: col gigante (gr. naturale).

Colonia gigante (agar fagiuoli, 25 g. a 24° C.).

Grande, rotonda, al centro rilevata e piana con larga fascia periferica più sottile con avvallamenti radiali ed orlo lobato.

Gelatina: non fluidifica.

Latte: rimane invariato.

Formazione di spore. Sporificazione relativamente facile, specie subito dopo l'isolamento, anche nella parte alta dei tubi di agar-inclinato, nella colonia gigante e in mosto. Aschi partenogenetici ovali od ellittici contenenti generalmente due, più raramente tre spore di forma rotonda o emisferica e di μ 2.4 – 3.2 di diametro.

Fermentazione degli zuccheri: negativa.

Assimilazione delle sostanze azotate:

peptone	+	(abb.)
asparagina	+	(abb.)
urea	—	
KNO_2	—	
KNO_3	—	
$(NH_4)_2 SO_4$	+	(discr.)

Sviluppo in presenza di alcool etilico. Abbastanza buono con formazione di torbidità e velo fino alla concentrazione del 2.5%. Per concentrazioni superiori fino al 10% solo torbidità e sedimento. In presenza del 12% nessuno sviluppo.

Posizione sistematica. In base ai caratteri fissati, con riferimento alla monografia della STELLIN-DEKKER, la specie qui descritta è identificabile con *Pichia membranaefaciens* HANSEN.

Oss. A parte il deciso carattere sporigeno, il comportamento generale di questa *Pichia* – come di altre specie appartenenti a tale genere – richiama molto da vicino il ritenuto asporigeno genere *Mycoderma.* Così nei caratteri morfologici (cellule ovali o largamente ovali fino a cilindriche con plasma più o meno omogeneo e vacuolo, di norma riunite in catena con formazione di rudimentale apparato pseudomicelico); così nei caratteri fisiologici (specie generalmente non fermentanti, non utilizzanti i nitrati, assimilanti l'alcool etilico); così nei caratteri colturali (formazione di veli nelle colture liquide).

D' altra parte, le specie di *Mycoderma* c' è oggi la tendenza di ritenerle capaci di sporificazione (KUFFERATH, SACCHETTI) sebbene tale potere vada perdendosi con il tempo e i successivi passaggi; perciò non potrebbe apparire azzardato il supporre, in considerazione di quanto sopra si è detto, che il gen. *Mycoderma* rappresenti la forma asporigena di *Saccharomycetaceae* e, più specialmente, del gen. *Pichia*.

Ceppi n.: 16: da uva "Peccecò curtu,,
18: „ „

Malto. Al 2° g. a 24° C. liquido torbo, velo sottile e anello risaliente: al fondo deposito. Non bollicine gassose, non modificazioni del mezzo colturale. Vegetazioni costituite da cellule ovali, mai allungate, di μ (2.4 – 3.3)×(4.9 – 6.6) gemmanti ad un polo od anche obliquamente a volte riunite in corte catene, con plasma omogeneo o, specie con il tempo, vacuolizzato.

Agar-malto. Patina continua, bianchiccia, molle, sottile. (In agar-fagiuoli vegetazione scarsa semitrasparente). Dopo 24 h. a 24° C. cellule subrotonde ma generalmente ovali od anche ellittiche, mai decisamente allungate, gemmanti, riunite talvolta, con plasma omogeneo con vacuolo e, meno spesso, rare granulazioni. Misurano in media μ (2.2 – 3.2) × (3.2 – 6.6) ma non mancano cellule di μ 4.9 × 8.2 o di μ 4.8 circa di diametro

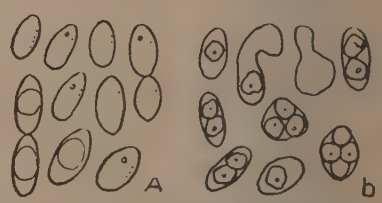

Fig. 12 – *Pichia (Zygopichia ?) uvarum* n. sp.

Colonia gigante su agar-fagiuoli al 20° g. a 24° C. Grande cm. 1.5 circa, rotonda, piatta, bianca, opaca, a superficie liscia con qualche solco nel senso radiale. Orlo lobato.

Gelatina. Sviluppo leggermente esteso anche lungo il fittone. Non fluidificazione.

Latte: rimane invariato.

Formazione di spore. Sporificazione facile anche in agar-fagiuoli. Aschi di

origine partenogenetica o, in qualche caso, preceduti da copula. Il processo copulativo non si è potuto, ad ogni modo, fissare con sicurezza. Gli aschi contengono 1-2 spore od anche, ma difficilmente 3 o, infine, in rarissimi casi 4- Sono rotonde o angolose con entro una goccia di grasso. Misurano + μ 3.2.

Fermentazione degli zuccheri:

glucosio	+	galattosio	—
levulosio	+	maltosio	—
mannosio	—	lattosio	—
saccarosio	—	raffinosio	±?

Assimilazione delle sostanze azotate:

peptone	±	KNO_2	—
asparagina	—	KNO_3	—
urea	—	$(NH_4)_2 SO_4$	±

Sviluppo in presenza di alcool etilico: discreto

Posizione sistematica. In base ai caratteri fissati la specie qui descritta è riferibile ai gen. *Pichia* o *Zygopichia*. Il riferimento generico appare incerto per misura prudenziale, non apparendo ben evidente l' atto copulativo precedente la formazione degli aschi.

Ad ogni modo, all' uno o all'altro genere appartenga (ed ulteriori ricerche potranno indicarlo) essa non è identificabile con alcuna delle specie note di *Pichia* tutte incapaci di fermentare, nè con le *Zygopichia* conosciute in quanto *Zygop. Chevalieri* (Guill.) Kloecker presenta cellule notevolmente più lunghe e caratteri sporologici diversi dalla specie da noi isolata.

Quindi crediamo lecito di tenere questa specie distinta e, pertanto, ne fissiamo la breve diagnosi:

Pichia (Zygopichia?) uvarum n. sp.

In malto, cellule ovali di μ (2.4 – 3.3) × (4.9 – 6.6) in media, non escluse cellule più lunghe; in agar-malto di μ 4.9 × 8.2. Velo nei mezzi liquidi e anello risaliente. Aschi partenogenetici o di dubbia origine sessuale contenenti 1-2 spore, difficilmente 3-4, rotonde o angolose, liscie.

Fermenta destrosio e levulosio. Non assimila nitrati. Sviluppa e forma velo in presenza di alcool etilico.

Su agar-malto patina biancastra, molle.

Hab. *isolata da uve in Macerata (Marche), ottobre 1934.*

Ceppo n. 1 : da vino bianco 1933.

Malto. Al 3° g. a 24° C. liquido quasi limpido ; in superficie anello appena percettibile e tracce di velo a isolotti. Al fondo deposito. Non bollicine gassose.

Al 30° g. il liquido è torbo, l' anello evidente e il deposito abbondante.

Fig. 13 – *Zygosacch. sp.* (in *B*, cell. sporificate)

Cellule ovali con plasma omogeneo o difficilmente granuloso misuranti μ (2.4 – 3.3) × (4.1 – 4.9).

Agar-malto. Patina continua, estesa, poltacea, bianco-opaca ad orlo liscio.

Dopo 24 h. a 24° C. cellule ovali, isolate o abbinate, gemmanti spesso lateralmente a contenuto protoplasmatico omogeneo. Misurano μ (2.5 – 3.3) × (4.1 – 4.9).

Al 15° g. cellule ancora ovali o subrotonde, in parte sporificate. Al 30° g. cellule in grande maggioranza sporificate.

Colonia gigante su agar-malto al 25° g. a 24° C.. Grande circa 2 cm. bianca, poltacea : superficie piana e liscia, orlo sinuoso solcato radialmente.

Gelatina : non fluidificazione al 60° g.. Sviluppo mediocre in superficie e lungo il fittone.

Latte : rimane invariato.

Formazione di spore. Si formano facilmente, specie nella parte alta dell' agar inclinato. Il processo di sporificazione è preceduto dalla copulazione pur non mancando aschi partenogenetici. Prevale l' eterogamia e in alcuni casi la copula avviene anche a mezzo di una cellula figlia che funziona da gamete, originatasi dal processo di gemmazione. In molte cellule durante la sporulazione si nota la emissione di corte appendici tubiformi di norma non partecipanti al processo copulativo.

Le spore sono contenute in numero di 3-4 per asco qualora questo abbia origine partenogenetica; oppure anche in numero di 1-2 quando la sua formazione sia preceduta da atti sessuali. Le spore sono rotonde, di μ 2 – 2.2 di diametro, liscie.

Fermentazione degli zuccheri. Non fermenta alcuno zucchero; forma acido da destrosio, levulosio, mannosio, saccarosio, galattosio, maltosio.

Assimilazioni

sostanze azotate:		sostanze carboniate:	
peptone	+ (discr.)	xilosio	—
asparagina	—	arabinosio	—
urea	—	destrosio	+ (buona)
KNO_2	—	levulosio	+ (buona)
KNO_3	±	mannosio	+ (buona)
$(NH_4)_2 SO_4$	—	saccarosio	+ (buona)
		galattosio	+ (medioc.)
		maltosio	+ (buona)
		raffinosio	—
		lattosio	—
		mannite	+ (scarsa)
		inulina	—
		glicerina	—
		alcool etil.	+ (abbon.)
		amido	+ (scarsa)
		destrina	—

Posizione sistematica. Per i caratteri sporologici questo ceppo rientra indubbiamente entro il gen. *Zygosaccharomyces.* In quanto ai caratteri specifici, essi sono tali avuto sopratutto riguardo alle fermentazioni, che non lo ravvicinano ad alcuna delle specie note del genere. *Zygosacch. Chevalieri* di GUILLIERMOND che era l'unica specie non fermentante è stata riportata da KLOECKER al gen. *Zygopichia* e come tale, anche, è riportata dalla STELLING-DEKKER. Il

nostro ceppo apparirebbe dunque come specie nuova e presenterebbe un certo interesse, riconoscendosi in *Zygosaccharomyces* lieviti di norma ad alta e indiscussa attività fermentativa. Tuttavia, essendosi questa specie, malauguratamente, perduta durante una nostra lunga assenza, la descrizione che è stata data ha solo scopo di segnalazione non rendendosi possibili ulteriori controlli.

4. – I lieviti asporigeni.

a) Non filamentosi.

Ceppo n° 23 : da uva Moscato.

Malto : dopo 3 g. a 24° C. liquido quasi limpido con scarso deposito. Al 15°-30° g. sviluppo un po' più evidente ma sempre limitato. Cellule tondeggianti o subovali, gemmanti, di μ 3,2 × 3.2 – 4.9.

Agar-malto. Patina abbondante di rapida crescita, estesa, da prima bianca, indi color carnicino, opaca, poltacea, scolante. Orlo continuo. Lo stesso aspetto in agar-fagiuoli. Dopo 24 h. a 24° C. cellule subrotonde od ovali con plasma omogeneo, gemmanti, di μ (2 – 3.2) × (3.2 – 4.9). Al 15°-30° g. cellule subovali od ovali con plasma raramente omogeneo ma quasi sempre granuloso. Misurano μ (2 – 3.2) × (3.4 – 4.9).

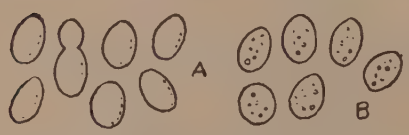

Fig. 14 – *Torulopsis carnescens* n. sp. in A dopo 24h, in B al 13°-30° giorno da colture in agar-malto.

Colonia gigante (su agar-malto al 20° g. a 24° C.), grande circa mm. 15, bianchiccia da prima, indi color carnicino; subrotonda, lucente, poltacea, con accenni di stratificazione non molto profonda, ad orlo quasi continuo.

Fig. 15–*T. carnescens* n. sp. col. gigante

Gelatina. Sviluppo in superficie e lungo il fittone. Fluidificazione, al 20° g. a di-

Fig. 16 – Infissione in gelatina di *T. carnescens* n.sp. (al 25° g.)

to di guanto che poi passa a cilindrica: liquido torbido con deposito al fondo.

Latte: leggera acidificazione.

Formazione di spore: negativa.

Fermentazione degli zuccheri: negativa. Poco acido forma da destrosio, levulosio, mannosio, saccarosio, maltosio, galattosio.

Assimilazioni

Sostanze azotate		Sostanze carboniate	
peptone	+	xilosio	+ (scarsa)
asparagina	+ (scarsa)	arabinosio	+ (discreta)
urea	—	destrosio	+
KNO_2	—	levulosio	+ (scarsa)
KON_3	—	mannosio	+ (scarsa)
$(NH_4)_2SO_4$	—	saccarosio	+ (scarsa)
		galattosio	+ (discreta)
		maltosio	+ (mediocre)
		lattosio	—
		raffinosio	+ (discreta)
		mannite	+ (discreta)
		inulina	+ (scarsa)
		glicerina	+ (scarsa)
		alcool etilico	—
		amido	—
		destrina	—

Posizione sistematica. Tenuti presenti i caratteri riportati e la chiave analitica del gen. *Torulopsis* in " Die anaskosporogenen Hefen ,, di LODDER, lo stipite in esame rientra nel gruppo delle specie non fermentanti, non assimilanti nitrati, a patine mucillaginose.

In questo gruppo troviamo *T. neoformans* (SANFELICE) LODDER, *T. flavescens* (SAITO) LODDER, *T. Laurentii* (KUFFERATH) LODDER e *T. luteola* (SAITO) LODDER.

Un esame differenziale a mezzo di prove parallele con queste specie, che non avevamo a nostra disposizione, si è reso impossibile. Tuttavia dalla descrizione di LODDER non ci sembra che il ceppo da noi isolato possa riportarsi a qualcuna di esse come facilmente può controllarsi.

Torulopsis carnescens n. sp.

Cellule rotonde, subrotonde fino a ovali, di μ *(2 – 3.2)* $\times$ *(3.2 – 4.9). In malto sviluppo modesto senza formazione di anello o di velo. Non fermenta. Assimila più o meno bene gl' idrati di carbonio escluso il lattosio. Scarsa utilizzazione dell' azoto proteico e amidico, mancata assimilazione dei nitrati e dei sali ammonici. Fluidifica la gelatina. Negli agar forma patine abbondanti, dense, poltaceo-mucilaginose ad orlo continuo, da prima bianchiccie, indi, con il tempo, di color carnicino.*

Hab. *isolata da uva "Moscatello„ presso Macerata, ottobre 1934.*

Ceppi n.: 27: da vino cotto 1933.
29: » » »

Malto. Dopo 3 g. a 24° C. liquido omogeneamente torbo, al fondo deposito più o meno denso, in superficie velo sottile e sottile anello.

Cellule piccole, da subrotonde ad ovali con plasma omogeneo e piccolo punto rifrangente di μ (2.4 – 3.3) $\times$ (3.3 – 4.95). Al 30° g. cellule ancora tondeggianti o ovali con vacuolo e qualche granulazione.

Fig. 17 – *Torulopsis minor* (POLL. et NANN.) LODDER in *A* cell. giovani, in *B* cell. di 30 g.

Agar-malto. Patina non molto abbondante, bianchiccia, opaca, non lucente, ad orlo continuo o frastagliato. (In agar-fagiuoli sviluppo più limitato). Cellule di aspetto e dimensioni come in malto.

Colonia gigante (agar-malto al 25° g. a 24°C.). Tondeggiante, bianchiccia, piuttosto sottile, priva di particolari strutture.

Gelatina. Non viene fluidificata.

Latte. Rimane invariato.

Formazione di spore: negativa.

Fermentazione degli zuccheri: negativa.

Assimilazioni:

sostanze azotate		sostanze carboniate	
peptone	+	destrosio	+
asparagina	+	levulosio	+
urea	+	mannosio	+
KNO_2	—	saccarosio	+
KNO_3	—	galattosio	+
$(NH_4)_2 SO_4$	+	maltosio	+
		lattosio	—

Sviluppo in presenza di alcool etilico: scarso.

Posizione sistematica. I caratteri fissati permettono di identificare questa specie con *Torulopsis minor* (Pollacci et Nannizzi) Lodder la prima volta isolata a Siena da lesioni epidermiche.

Fig. 18 – *Torulopsis uvae* (Poll. et Nann.) Lodder

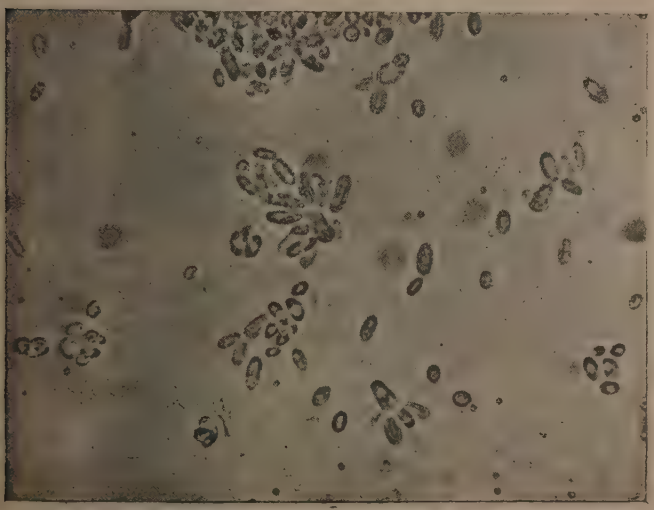

Fig. 19 – *Torulopsis uvae* (Poll. et Nann.) Lodder da coltura in agar fagiuoli di 15 g. a 24° C. (in gr. 1100 circa)

Ceppi n.: 37: da uva "Picurì"
68: da uva "Cimiciara"
70: " "
76: da uva Sangiovese.

Malto. Dopo 3 g. a 24° C liquido omogeneamente torbo; al fondo deposito, in superficie sottile anello, velo.

Cellule subovali, ovali o ellittiche con plasma omogeneo bene spesso vacuolizzato, di μ (3.3 – 4.95) $\times$ (4.95 – 8.25).

Agar-malto. Patina non molto abbondante, non mucilaginosa, piuttosto sottile, ad orlo continuo o leggermente frastagliato. (In agar fagiuoli sviluppo notevolmente più limitato). Struttura, dimensioni, forma delle cellule pressochè identiche a quelle in malto.

Colonia gigante (su agar malto al 25° g. a 24° C.). Piatta, liscia, priva di particolari strutture.

Gelatina. Non fluidificazione.

Latte. Rimane invariato.

Formazione di spore. Non osservata nè in agar-Gorodkowa nè su blocchetti di gesso.

Fermentazione degli zuccheri. Negativa.

Assimilazioni:

sostanze azotate		sostanze carboniate	
peptone	+	destrosio	+
asparagina	+	levulosio	+
urea	±	mannosio	+
KNO_2	—	galattosio	—
KNO_3	—	saccarosio	—
$(NH_4)_2 SO_4$	+	maltosio	—
		lattosio	—

Sviluppo in presenza di alcool etilico: scarso.

Posizione sistematica. In base ai caratteri fissati e con riferimento alla

monografia della LODDER la specie descritta è identificabile con *Torulopsis uvae* (POLL. et NANN.) LODDER. L'unica trascurabile differenza che può esserci è la non sempre osservata tendenza alla formazione di abbozzi pseudo miceliari. Questa specie richiama in particolare *Torulopsis minor* (POLL. et NANN.) LODDER, dalla quale differisce per le dimensioni delle cellule e il comportamento di fronte all'assimilazione degli zuccheri, ed alcuni *Mycoderma* ove si ha una rudimentale ma evidente formazione di apparato blastosporeo.

Ceppo n. 8 : da uva " Biancone „
10 : „ „
39 : da uva " Picurì „.

Malto. Al 3° g. a 24° C. liquido poco torbo con deposito al fondo ; in superficie non anello, non velo. Al 30° g. liquido ancora torbo con deposito e anello.

Cellule ovali con vacuolo omonogeneo di μ 3.3 × 3.8 - 6.2 - 6.6 e con il tempo, miste a queste cellule, rotonde, grandi, con goccia oleosa.

Agar-malto. Dopo 24 h. a 24° C. cellule ovali con plasma omogeneo o granuloso o con vacuolo, di μ (3.8 - 4,1) × (4.9-5.6) miste a grandi cellule rotonde con grossa goccia di grasso di μ + 8.2 - 8.6 di diametro.

Fig. 20 – *Torulopsis pulcherrima* (LINDNER) SACC.

Patina continua, opaca, poltacea, bianca o rossa se in presenza di tracce di ferro, ad orlo continuo.

Colonia gigante : tipo *Torulopsis.*

Gelatina : sviluppo in superficie e lungo il fittone ; non fluidificazione.

Latte : rimane invariato.

Fermentazione degli zuccheri :

	Gas	Acido
destrosio	+	+
levulosio	+	+

mannosio	—	+
galattosio	—	+
saccarosio	—	+
maltosio	—	+
lattosio	—	—
raffinosio	—	—

Assimilazioni

Sostanze azotate		Sostanze carboniate	
peptone	+	destrosio	+
asparagina	+	levulosio	+
urea	+	mannosio	+
KNO_2	—	galattosio	+
KNO_3	—	saccarosio	+ (poco)
$(NH_4)_2 SO_4$	+	maltosio	+
		lattosio	—
		raffinosio	—

Sviluppo in presenza di alcool etilico: scarso.

Posizione sistematica. I caratteri fissati permettono di avvicinare questa specie al gruppo di *Torulopsis pulcherrima* (LINDNER) SACC. seguendo l' ordinamento sistematico di LODDER. Tuttavia crediamo di dover accettare con una qualche riserva le conclusioni alle quali perviene la LODDER a proposito di questa specie, in quanto essa non ha studiato il ceppo originale di LINDNER ma un ceppo inviato al " C. B. S. „ da A. T. HENRICI.

Non è detto quindi che il ceppo descritto dalla LODDER possa, in modo probativo, assimilarsi alla specie originaria e che la sinonimia fissata da questa Autrice per. *T. pulcherrima* sia del tutto esatta.

Infine, è da notare che il nostro stipite non fermenta il mannosio che invece dimostrerebbe di fermentare il ceppo studiato a DELFT.

Ceppi n. 47 : da uva Trebbiano.
45 : „ „

Malto. Torbidità, anello, deposito. Dopo 24 h. a 24° C. cellule ovali, naviculari o limoniformi con plasma omogeneo o con vacuolo misuranti μ 1.65 $\times$ 3.3 oppure μ (3.3 – 4.5) $\times$ (6.6 – 8.25). Dopo qualche giorno tendenza ad aversi cellule più lunghe e più frequentemente limoniformi.

Agar-malto. Patina bianca, continua, non molto abbondante, opaca al centro e alla periferia un po' più sottile. (Sviluppo limitato in agar-fagiuoli). Cellule ovali o naviculari o limoniformi di μ (1.65 – 3.3) $\times$ (4.95 – 8.25).

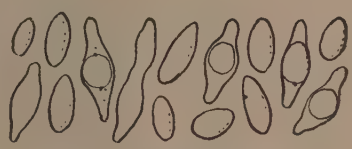

Fig. 21 – *Kloeckera apiculata* (Reess) Janke

Colonia gigante su agar malto al 20° g. a 24° C. Rotonda, piatta, priva di particolari strutture.

Gelatina. Sviluppo in superficie e mediocre lungo il fittone. Rammollimento, non decisa fluidificazione.

Latte: rimane invariato.

Fermentazione degli zuccheri:

destrosio	+	galattosio	—
levulosio	+	maltosio	—
mannosio	±	lattosio	—
saccarosio	—	raffinosio	—

Assimilazione delle sostanze azotate:

peptone	+	KNO_2	—
asparagina	—	KNO_3	—
urea	—	$(NH_4)_2 SO_4$	—

Sviluppo in presenza di alcool etilico: scarsissimo.

Posizione sistematica. Trattasi di *Kloeckera apiculata* (Reess emend. Kloecker) Janke.

Ceppi n. 12A : da uva " Cacciò ".
40 : da uva " Picurì "
44 : da uva " Trebbiano ".
69 : da uva " Cimiciara ".
77 : da uva " Sangiovese ".

Fig. 22 – *Mycoderma cerevisiae* Desm.
A, ceppo n. 77 *B*, ceppo n. 44

Malto. Al 3° g. a 24° C. liquido omogeneamente torbo. Al fondo deposito più o meno denso, in superficie velo e anello con vegetazione risaliente. Non bollicine gassose. Al 30° g. il liquido schiarisce mentre si fa più denso il deposito al fondo del tubo di coltura.

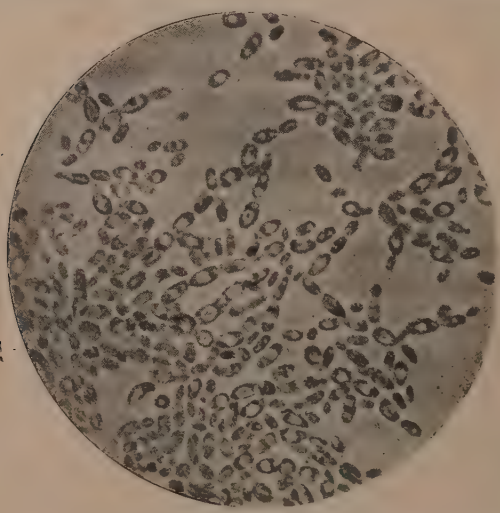

Fig. 23 – *Mycoderma cerevisiae* Desm. c. 69. Microcoltura in malto di 2 g. a 24° C. (in gr. 1000)

Cellule subovali, ovali o ellittiche fino a cilindriche con contenuto protoplasmatico omogeneo o con vacuolo. Misurano in grande media μ (3.3 – 4.95) × × (4.95 – 6.6) con alcune di μ (4.9 – 6.6) × (8.25 – 9.6). Presenza più o meno evidente di pseudoifi di μ 3.3 × 11.5, vacuolati e con guttule. Il processo di gemmazione è attivo: le cellule gemmano ad un polo o obliquamente originando una gemma od anche molte, fino a sette (specialmente evidente questa gem-

mazione multipla in agar-fagiuoli) a lor volta gemmanti a formare brevi catene con abbozzi di ramificazioni. Fatti analoghi sono comuni anche a *Torulopsis uvae* (POLL. et NANN.) LODDER. Apparato pseudomicelico e blastosporeo ridotto.

Agar-malto. Patina sottile, membranaceo-poltacea, non mucillaginosa, lievemente increspata, opaca, ad orli più o meno frastagliati. (In agar-fagiuoli sviluppo meno evidente di patina sottile semitrasparente). Vegetazioni come in malto salvo lievi differenze morfologiche in relazione ai diversi stipiti. Il quadro generale, comunque, non cambia e tali differenze non sono sopravalutabili.

Colonia gigante su agar-malto dopo 20 g. a 24° C.. Piatta, poco densa, bianchiccia, liscia o lievemente increspata.

Gelatina. Al 60° g. sviluppo in superficie ed anche lungo il fittone a mezzo di sottili ramificazioni laterali : non fluidificazione.

Latte : rimane invariato.

Formazione di spore. Non osservate nè in agar-Gorodkowa nè sui blocchetti di gesso. (Le osservazioni furono eseguite dopo otto mesi dall'isolamento)

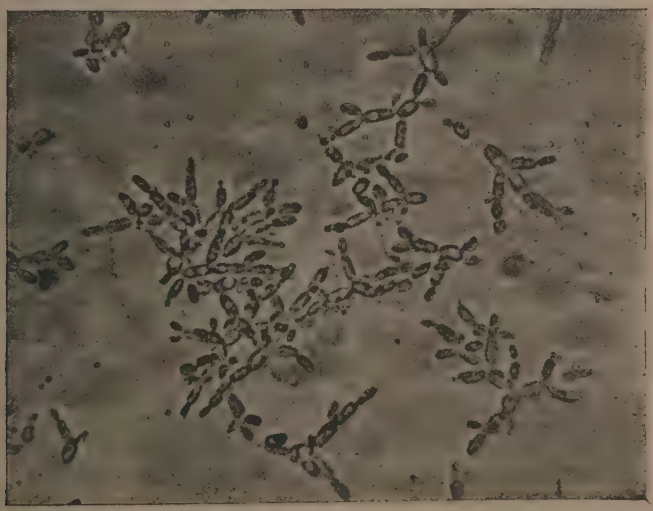

Fig. 24 – *Mycoderma cerevisiae.* DESM. c. 40. Microcoltura in malto al 20° g. (ingr. 925 circa)

Fermentazione degli zuccheri: negativa.

Assimilazione delle sostanze azotate

peptone	+ (buona)	KNO_2	—
asparagina	+ (mediocre)	KNO_3	—
urea	+ (scarsa)	$(NH_4)_2SO_4$	+ (scarsa)

Assimilazione delle sostanze carboniate

xilosio	—	lattosio	—
arabinosio	—	raffinosio	—
destrosio	+	mannite	+ (scarsa)
levulosio	+	inulina	+ (scarsa)
mannosio	+	amido	—
saccarosio	—	destrina	—
galattosio	—	alcool etil.	+ (buona)
maltosio	—	glicerina	—

Oss. In alcool etilico lo sviluppo appare considerevole con formazione di coperta alta, resistente, grinzosa.

Posizione sistematica. Con riferimento a quanto è fissato in " Die anaskosporogenen Hefen „ di LODDER e senza entrare per il momento in questioni generiche circa la validità da taluno discussa del gen. *Mycoderma*, i ceppi in esame rientrano chiaramente in *Mycoderma cerevisiae* DESM., avuto specialmente riguardo alla formazione di coperta nei substrati contenenti alcool, coperta che invece non formerebbe nei medesimi, e sempre secondo LODDER,

Mycoderma vini Desm..

Oss. Lo studio di questi ceppi venne eseguito, per mancanza di tempo, dopo vari mesi del loro isolamento. La mancata osservazione tempestiva non ci ha quindi permesso di stabilire se, come taluno avrebbe osservato, tali specie sono sporigene e pertanto riferibili a *Saccharomycetaceae.*

b) Asporigeni filamentosi.

Ceppi n. 11: da uva Cacciò
„ 26: „ v. bian. 1934

Malto. Sviluppo abbondante con torbidità, sedimento, folto velo con vegetazione risaliente fin dalla 48ª ora a 24°C. Bollicine gassose in superficie. Vegetazioni di aspetto micotoruloideo con filamenti micelici non sempre molto lunghi e blastospore ovali o ellittiche di μ 3.3 × 5.7 – 8.2. Dal 3° al 30° g. aspetto del liquido identico. Formazione di filamenti più evidente; blastospore con 1-2 guttule e vacuolo.

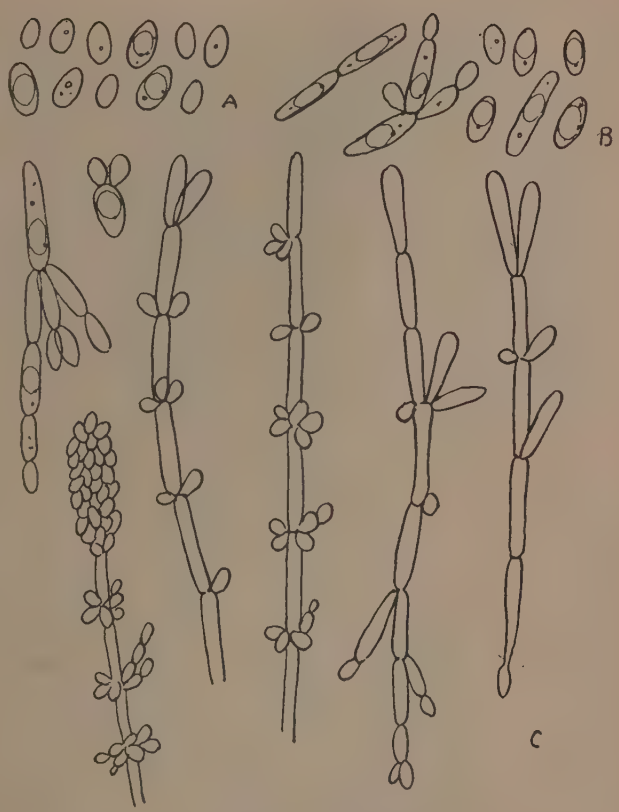

Fig. 25 – *Mycotorula vini* n. sp. vegetazioni in agar-malto *A*, dopo 24 h.; *B*, dopo 10-15 g; *C*, al 30° giorno.

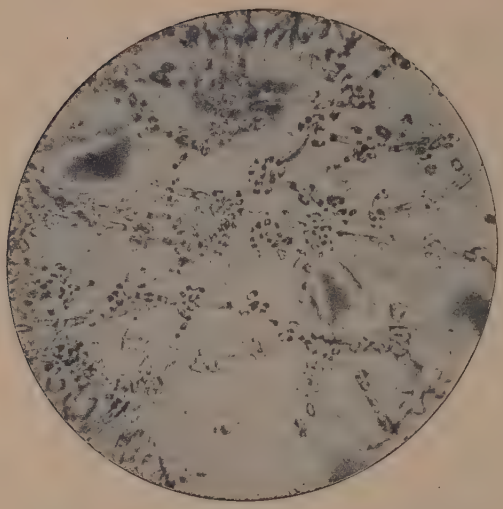

Fig. 26 – *Mycoto·ula vini* n. sp. veg. tipo *Mycotorula* (in gr. 600)

Agar-malto. Patina di rapida crescita, estesa, bianca, poltacea, opaca, più densa al centro che alla periferia limitata da orlo degradante, lobato. Deposito al fondo risaliente lungo le pareti del vetro. Dopo 24 h. a 24° C. blastospore ovali o ellittiche con una o più goccie e vacuolo di dimensioni varie: le più piccole misurano μ 1.6 × 3.2, le più grandi 3.2 × 6.6 – 8.2. Al 15° g. cellule ancora ovali od allungate ma di dimensioni più uniformi con abbozzi di ifi. Al

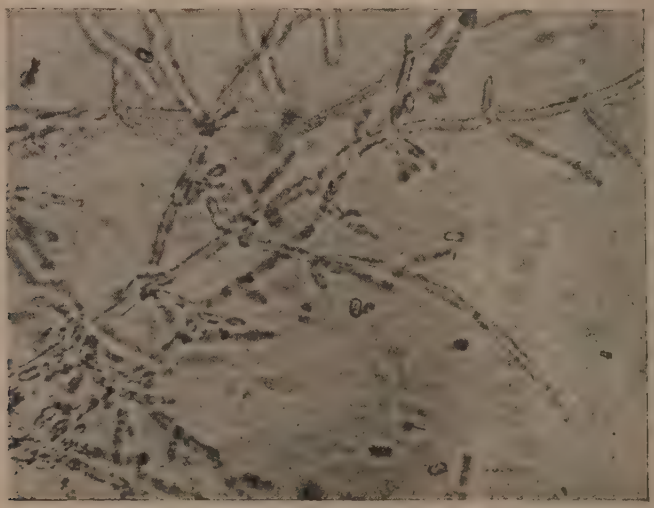

Fig. 27 – *Mycotorula vini* n. sp. veg. tipo *Mycocandida* (ingr. 900)

30° g. apparato filamentoso non molto sviluppato ma ben distinto; blastospore ovali o anche ellitiche fino a cilindriche di μ (3.2 - 4.9) × (4.9 - 8.2).

Queste blastospore prendono origine, generalmente, in corrispondenza dell' articolazione dei setti dando luogo a figure di *Enantiothamnus* risolventisi poi in *Mycotorula* o *Mycotoruloides*. Il quadro di tali passaggi è completo e più o meno evidente a seconda del substrato e dell' età. In genere, le forme più evolute sono le più tarde a comparire. Non è infrequente il caso che tra le forme suddette compaiano vegetazioni del tipo *Mycocandida* ma non di *Candida* e non prevalenti sulle prime.

Colonia gigante. Grande, circolare, rilevata, opaca, poltacea. Una piccola zona centrale si sopraeleva su di una ampia zona piana ad orlo irregolare fortemente lobato con deviazioni arborescenti; essa è delimitata da una fascia degradante con profondi solchi radiali ed orlo lobato-frangiato.

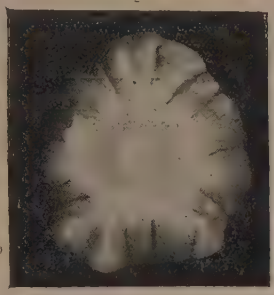

Fig. 28 - *Mycotorula vini* n. sp. Col. gigante dopo 20 g. a 24°C in agar-fagioli (grand. naturale)

Gelatina. Sviluppo limitato, non fluidificazione.

Latte: invariato.

Formazione di spore: negativa.

Fermentazione degli zuccheri:

	Gas	Acido
xilosio	—	—
arabinosio	—	—
destrosio	+	+
levulosio	+	+
mannosio	+	+
saccarosio	+	+
galattosio	+	+
maltosio	+	+

lattosio	—	—
raffinosio	+	+
mannite	—	—
inulina	—	—

Assimilazioni:

Sostanze azotate			Sostanze carboniate		
peptone	+	(abb.)	xilosio	—	
asparagina	+	(scarsa)	arabinosio	—	
urea	—		destrosio	+	(abbond.)
KNO_2	—		levulosio	+	(buona.)
KNO_3	—		mannosio	+	(discr.)
$(NH_4)_2SO_4$	+	(buona)	saccarosio	+	(abbond.)
			galattosio	+	(scarsa)
			maltosio	—	(buona)
			lattosio	—	
			raffinosio	—	(scarsa)
			mannite	—	
			inulina	—	
			alcool etilico	—	(scarsa)
			glicerina	—	
			amido	—	
			destrina	—	

Oss. In genere, coperta più o meno spessa, risaliente, tortidità, deposito.

Posizione sistematica. Avuto presente il quadro speciologico di Ciferri e Redaelli ([10]) questa specie – che rientra nel genere *Mycotorula* – sembra non potersi identificare con alcuna di quelle note e fino ad oggi descritte o rivedute. Avuto riguardo ai caratteri morfologici e alle attività fermentative la specie più

vicina può apparire *Mycotorula trimorpha* Red. et Cif. dalla quale tuttavia si discosta notevolmente per il complesso dei caratteri siccome è emerso dallo studio parallelo e comparativo eseguito a mezzo del ceppo originale avuto dalla cortesia del Prof. P. Redaelli. Per ciò crediamo lecito di tenere la nostra specie distinta e ne diamo la succinta diagnosi.

Mycotorula vini n. sp.

Colonia gigante grande, bianca, poltacea, circolare, con una piccola zona centrale un poco sopraelevata su di una ampia zona piana bianco-latte ad orlo irregolare fortemente lobato e circondata da una fascia degradante ad orlo lobato su profondi solchi radiali.

Caratteri micromorfologici del tipo prevalente di " Mycotorula „ su "Mycocandida„ - Blastospore ovalari; non clamidospore.

Fermenta destrosio, levulosio, mannosio, saccarosio, maltosio, galattosio, e a volte raffinosio.

Non fluidifica la gelatina - Non assimila l'azoto nitrico ma singolarmente bene il solfato ammonico.

Sugli agar, patina bianca rilevata al centro, poltacea, opaca, scolante, risaliente - Nei mezzi liquidi, anello risaliente, coperta.

Hab. *isolata da uva e vino a Macerata, ottobre 1934.*

A termine della descrizione speciologica sarà opportuno di riunire in un unico quadro le diverse specie con l' indicazione della provenienza e in altra tabella calcolare la frequenza di isolamento onde porre in maggiore rilievo i reperti microbiologici conseguiti.

Dalla Tab. I come dalla Tab. II si rileva come la specie più frequente sia rappresentata da *Sacch. ellipsoideus* cui fanno seguito in percentuale notevolmente inferiori *Mycoderma cerevisiae, Pichia membranaefaciens, Torulopsis uvae* e specie minori. Emerge sopra ogni altra cosa la relativa frequenza dei ricordati *Mycoderma cerevisiae* e *Pichia membranaefaciens* e la scarsezza di apiculati.

Il fatto di non avere isolato da alcuni campioni *Saccharom. ellipsoideus*

non prova la sua assenza in essi essendosi reso impossibile di isolare tutti i ceppi apparsi nelle colture d' isolamento.

TABELLA I

Provenienza	n° di isol.	Specie	Provenienza	n° di isol.	Specie
UVE:					
Biancone	8	Torulopsis pulcherrima	*Brugnintì*	62	Sacch. ellipsoideus
	9	Kloeckerasp. uvarum		64	—
	10	Torulopsis pulcherrima	*Duracino*	65	Pichia membranaefaciens
Cacciò	11	Mycotorula vini		66	Sacch. ellipsoideus
	12A	Mycoderma cerevisiae		67	—
	12B	Sacch. ellipsoideus	*Cimiciara*	68	Torulopsis uvae
Chiapparò	13	—		69	Mycoderma cerevisiae
	14A	—		70	Torulopsis uvae
	14B	—	*Montepulc.*	71	Sacch. ellipsoideus
Peccecò curtu	16	Pichia uvarum		72	—
	17	Kloeckerasp. uvarum		73	—
	18	Pichia uvarum	*Moscatello*	23	Torulopsis carnescens
Malvasia	19	Sacch. ellipsoideus		74	Sacch. ellipsoideus
	20	—		75	—
	21A	—	*Sangiovese*	76	Torulopsis uvae
	21B	—		77	Mycoderma cerevisiae
	22	—	*Tintoria*	78	Sacch. ellipsoideus
Moscatello	34	—		79	—
	35	—	*Tokay*	80	—
	36	—		81	—
Picurì	37	Torulopsis uvae		82	—
	39	Torulopsis pulcherrima			
	40	Mycoderma cerevisiae	*VINI:*		
Santa Maria	42	Sacch. ellipsoideus	*v. cotto 1919*	7	Sacch. ellipsoideus
	43	—	— *1933*	27	Torulopsis minor
Trebbiano	44	Mycoderma cerevisiae		28	Sacch. ellipsoideus
	45	Kloeckera apiculata		29	Torulopsis minor
	46	Pichia membranaefaciens	— *1934*	30	Pichia membranaefaciens
	47	Kloeckera apiculata		31	Sacch. ellipsoideus
Verdicchio	48	Sacch. ellipsoideus	*v. bianc. 1933*	1	Zygosaccharomyces sp.
	49	—		3	Sacch. ellipsoideus
	50	—	— *1934*	24A	—
	51	—		24B	—
Uva grana	52	—		25	—
	53	—		26	Mycotorula vini
	54	—	*v. rosso 1933*	4	Pichia membranaefaciens
Barzamina	55	—		5	Torulopsis sp.
	56	—		6	Torulaspora Rosei
	57	—	*v. rosso 1934*	22	Sacch. ellipsoideus
	58	Sacch. Mangini		33A	—
Bordeaux	59	Sacch. ellipsoideus		33B	—
	60	—			
	61	—			

TABELLA II.

Specie isolate	n° dei campioni da cui la specie fu isolata (tot. camp. n° 28)	% dei campioni	n° degli stipiti isolati (tot. stipiti n° 82)	% degli stipiti
Sacch. ellipsoideus	21	75.–	51	62.2
Mycoderma cerevisiae	5	17.8	5	6.1
Pichia membranaefaciens	4	14.3	4	4.8
Torulopsis uvae	3	10.8	4	4.8
— *pulcherrima*	2	7.1	3	3.6
Kloeckera uvarum	2	7.1	2	2.4
Pichia uvarum	1	3.6	2	2.4
Torulopsis minor	1	3.6	2	2.4
Kloeckera apiculata	1	3.6	2	2.4
Mycotorula vini	2	7.1	2	2.4
Sacch. Mangini	1	3.6	1	1.2
Zygosacch. sp.	1	3.6	1	1.2
Torulaspora Rosei	1	3.6	1	1.2
Torulopsis carnescens	1	3.6	1	1.2
— sp.	1	3.6	1	1.2

In confronto dei risultati di DE' ROSSI relativi ai mosti umbri avremmo nelle uve e nei vini di Macerata una maggiore ricchezza di specie, particolarmente di lieviti non sporigeni, invero non prendenti parte attiva al processo di fermentazione; una notevolmente minore presenza di apiculati (assente *Kloeckera*

magna); ed infine, come in quelli, presenti *Torulopsis pulcherrima* e *Torulaspora Rosei.*

5 – Resistenza alle varie temperature

Come è stato premesso non si sono volute trascurare alcune ricerche com-

TABELLA III

			sviluppo dopo 10′ a:					
			50°	55°	60°	65°	70°	75°
Sacch. ellipsoideus . . .	c. 7	c. vegetative	+	+	+	±	—	—
		spore	+	+	+	+	+	+
—	c. 49	c. vegetative	+	+	+	—	—	—
		spore	+	+	+	+	±	—
—	c. 82	c. vegetative	+	+	+	—	—	—
		spore	+	+	+	+	—	—
—	c. 21	c. vegetative	+	+	+	±	—	—
		spore	+	+	+	+	+	—
—	c. 42	c. vegetative	+	+	+	—	—	—
		spore	+	+	+	+	—	—
—	c. 61	c. vegetative	+	+	+	—	—	—
		spore	+	+	+	+	—	—
—	c. 79	c. vegetative	+	+	+	±	—	—
		spore	+	+	+	+	±	—
—	c. 28	c. vegetative	+	+	+	—	—	—
		spore	+	+	+	+	—	—
—	c. 48	c. vegetative	+	+	+	—	—	—
		spore	+	+	+	+	+	+
—	c. 80	c. vegetative	+	+	+	±	—	—
		spore	+	+	+	+	±	—
Kloecheraspora uvarum . . .		c. vegetative	+	—	—	—	—	—
		spore	+	±	—	—	—	—
Pichia membranaefaciens . . .		c. vegetative	+	±	—	—	—	—
		spore	+	+	+	—	—	—
Pichia uvarum		c. vegetative	+	+	+	—	—	—
		spore	+	+	+	+	—	—
Torulopsis carnescens			—	—	—	—	—	—
— *minor*			+	+	+	—	—	—
— *uvae*			+	+	+	—	—	—
Mycotorula vini			+	+	+	+	+	—

plementari quali, in primo luogo, la resistenza delle diverse specie alle varie temperature.

I saggi furono eseguiti riscaldando delle provettine di malto insemenzate con materiale proveniente da colture su agar (sporificate e non sporificate per i lieviti sporigeni) per 10′ alle temperature di 50° - 55° - 60° - 65° - 70° - 75° C., indi eseguendo passaggi su agar che veniva coltivato in termostato a 24° C. I risultati sono riportati nella Tab. III.

Nulla da rilevare, a proposito di questi dati, oltre quanto è noto sulla termoresistenza dei lieviti. Si segnala appena la maggiore tolleranza, rispetto agli altri ceppi, dello stipite n° 7 di *Sacch. ellipsoideus*: esso fu isolato da vino cotto del 1919. Non un comportamento decisamente diverso fu dato di osservare tra colture sporificate e non sporificate di *Kloeckeraspora uvarum* giusta quanto fu scritto a proposito di questa specie. Abbastanza resistente si addimostrò *Mycotorula vini* e molto poco, per contro, *Torulopsis carnescens*.

6 - Tollerabilità di fronte all' alcool ed all' acido tartarico.

Le esperienze delle quali qui si riferisce sono state eseguite coltivando i lieviti in cc. 25 di mosto contenuto in matraccini da cc. 50 a 24° C. Lo sviluppo è stato seguito con il rilievo giornaliero dell' intorbidamento, sedimento, formazione di anello e velo, ove si aveva, e l' attività fermentativa dall' altezza del colletto di schiuma che si formava, con l'agitazione, alla superficie del liquido. Le quantità di alcool etilico furono aggiunte fino al 15 % attraverso le gradazioni 1 - 2.5 - 5 - 10 - 12 %; quelle di acido tartarico fino al 4 %.

Per brevità i relativi reperti conseguiti non li riportiamo con dettaglio, implicando questo la elaborazione di assai lunghe tabelle; ci limitiamo, ritenendolo sufficiente, alla segnalazione dei fatti più salienti quali risultano dal protocollo delle esperienze.

a) *Tollerabilità di fronte all' alcool etilico*

Riferendoci anzitutto a *Sacch. ellipsoideus* qualche differenza si è notata limitatamente ai ceppi in prova, sia nell'attività fermentativa, che nella tollera-

bilità di fronte all'alcool aggiunto. Così, per esempio, mentre i lieviti n.: 49 - 80 - 72 - 50 - 28 - 48 - 24B - 79 - 82 hanno iniziato la fermentazione entro le ventiquattro ore, nei lieviti n.: 31 - 42 - 61, e forse anche 59 l'attività fermentativa non si è dimostrata che al secondo giorno. Questi ultimi hanno presentato anche una minore tolleranza di fronte alle quantità più forti di alcool aggiunto.

Nei particolari riguardi di questa tollerabilità il 5 - 10% di alcool si è già dimostrato per la generalità dei ceppi ostacolante o meglio ritardante la fermentazione. Il 12% ha ancora più ritardata la fermentazione e, mentre i ceppi n. 82 - 42 - 61 non si sono neppure sviluppati, il n. 79 si è sviluppato soltanto al 5. giorno fermentando appena al 6°. Il 15% è stato tollerato mediocremente dal ceppo n. 7 che si è dimostrato ancora capace di una certa, sia pur lenta e ridottissima, attività fermentativa. Notiamo di passaggio che questo ceppo venne isolato da vino cotto conservato in botte da 15 anni e con un grado alcoolico di 14,85. Si sono sviluppati, tra il 5° - 6° g., non fermentando, i ceppi n. 28 - 48 - 24B - 72; non si sono sviluppati i ceppi n. 49 - 80 - 79 - 82 - 31 - 50 - 59 - 42 - 61.

Kloeckeraspora uvarum dimostrò di non tollerare oltre il 5% di alcool etilico.

Torulaspora Rosei ne tollera, sebbene vi si sviluppi scarsamente e lentamente, anche il 10%. Di fronte a tale concentrazione, però, sospende la sua attività fermentativa.

Le altre specie non sporigene arrestano il loro sviluppo in presenza di alcool in quantità superiori al 5%.

Mycotorula vini ne tollera bene il 5%. Di fronte a quantità pari al 10% ritarda l'inizio e l'intensità fermentativa; in presenza del 12% sviluppa in ritardo e non fermenta più; mentre il 15%, infine, ne impedisce anche lo sviluppo.

b) *Comportamento di fronte all'acido tartarico*

Nei riguardi di *Sacch. ellipsoideus* nessun ceppo ha dimostrato un particolare comportamento di fronte all'acido tartarico, e le quantità pari al 2% sono state abbastanza bene tollerate. Il 3% si è incominciato a dimostrare ostacolante;

la fermentazione, tuttavia, ritardata e debolissima, ha avuto luogo per ogni stipite fatta solo eccezione per il n. 7. Nella concentrazione del 4% l'acido tartarico ha impedito la fermentazione in ogni ceppo e il n. 49, anzi, non si è neppure sviluppato.

Pichia membranaefaciens e *Pichia uvarum* si sono, invece, sviluppate benissimo e pari ai controlli (sia pure con leggero ritardo) in tutte le concentrazioni aggiunte e così *Mycotorula vini.* Anche *Kloeckera apiculata* ha tollerato la concentrazione del 4%, mentre non oltre il 2% è stato tollerato dalle altre specie di lieviti non sporigeni.

7 - Associazione di più specie e più razze nella fermentazione

Uno degli attuali problemi della Microbiologia agraria ed anche parassitologica animale e vegetale è quello relativo allo studio delle associazioni microbiche. Questo particolare tema della Microbiologia appare, invero, non essere stato ancora sufficientemente indagato e se, per quel poco che è stato fatto, è dato di stabilire che l' unione sinergetica di due o più specie microbiche, sistematicamente simili o anche diverse, porta in linea generica all' esaltamento o alla depressione delle singole attività, esempi specifici difettano e pratiche immediate applicazioni mancano. Tanto meno di questi fenomeni ne sono state indagate le cause.

Uno di noi già da qualche tempo ha cercato di occuparsi dell'argomento, particolarmente studiando, sotto questo punto di vista, il processo di acidificazione del latte ([11]) mentre nel contempo o poco prima eseguiva esperienze preliminari sulle associazioni microbiche nella fermentazione vinaria ([4]).

Nei riguardi di quest' ultima la questione si riallaccia a quella dei cosi detti fermenti selezionati i quali spesse volte, come è noto, vengono venduti quali lieviti adatti alla fermentazione di mosti di qualsiasi uva e di qualsiasi regione. Ma a parte questo fatto, non avente esatto riscontro nelle acquisizioni della tecnica microbiologica della fermentazione vinaria, la tesi che andiamo sostenendo e che sempre più ci appare di indubbia chiarezza é che l'integrale processo trasformativo del mosto non possa conseguirsi con l' uso di una sola razza (e forse

di una sola specie) ma che si renda necessario per esso l'intervento simultaneo o successivo di due, tre, forse più razze o specie: e questo non soltanto in vista del rendimento alcoolico, ma anche e sopratutto per quanto ha riferimento al complesso degli altri caratteri chimici ed organolettici.

Le esperienze occasionate dal presente lavoro e che qui appresso riferiamo riguardano la fermentazione del mosto per opera di un ceppo di *Sacch. ellipsoideus* socio o meno ad altre specie e per opera di più razze, isolate o in associazione, di *Sacch. ellipsoideus.*

Per il primo gruppo di prove si sarebbe prestata bene la combinazione " ellittico - apiculato „ data anche la particolare frequenza con cui quest'ultimo viene isolato; ma tale combinazione già da tempo è stata oggetto di ricerche da parte di De' Rossi e inutile sarebbe oggi il ritornarvi ([12]). Abbiamo quindi unito a *Sacch. ellipsoideus* altre specie e cioè *Torulaspora Rosei* che sembra rinvenirsi abbastanza di frequente nei mosti (De' Rossi – Castelli e questo lavoro) e *Mycotorula vini,* nostra nuova specie, data la sua piuttosto forte attività fermentativa.

Le esperienze vennero eseguite su sufficienti quantità di mosto sterilizzato in corrente di vapore. I lieviti nelle varie combinazioni vennero inoculati in quantità pressochè uguali e la fermentazione si fece svolgere a temperatura oscillante tra i 22° - 24° C. Le determinazioni analitiche nei mosti di partenza e nei liquidi fermentati al 5° e 12° giorno compresero le determinazioni dell' alcool, dell' acidità (totale, volatile, fissa) e degli zuccheri riduttori.

I risultati sono riportati nella tabella annessa.

Caratteristiche del mosto di partenza:

zuccheri riduttori	%	27,55
ac. totale (ac. tartarico)	„	0.579
„ volatile (ac. acetico)	„	0.1062
„ fissa (ac. tartarico)	„	0.4453

TABELLA IV

	al 5° giorno				al 12° giorno			
	alcool %	ac. totale ‰ (ac. tartarico)	ac. volatile ‰ (ac. acetico)	ac. fissa ‰ (ac. tartarico)	alcool %	ac. totale ‰ (ac. tartarico)	ac. volatile ‰ (ac. acetico)	ac. fissa ‰ (ac. tartarico)
Sacch. ellipsoideus	1.25	8.28	1.28	6.67	7.50	9.33	1.48	7.47
Torulaspora Rosei	1.25	8.28	0.93	7.12	4.50	8.85	2.11	6.22
Mycotorula vini	1.–	8.04	1.20	6.67	5.–	8.52	1.09	7.09
Sacch. ell. + *Torulasp. Rosei*	2.45	7.40	0.94	6.22	8.50	9.18	1.58	7.20
– + *Mycotorula vini*	3.–	7.72	1.11	6.33	7.10	8.28	1.89	5.92
Mycot. vini + *Torulasp. Rosei*	0.98	7.72	1.01	6.45	4.–	8.44	1.94	6.02
Sacc. ell. + *Tor. Ros.* + *Myc. v.*	3.57	8.85	1.40	7.10	6.50	8.21	1.99	5.72

Analizziamo i risultati. Per quanto si riferisce all'attività fermentativa delle singole specie *Sacch. ellipsoideus* è quello che naturalmente ha fornito una quantità di alcool maggiore; seguono *Mycotorula vini* e *Torulaspora Rosei.*

Nei riguardi delle diverse combinazioni le unioni di *Saccharomyces* con le altre specie hanno portato ad un acceleramento del processo ed anche, in parte, ad un rendimento alcoolico maggiore: degni di nota, al riguardo, sono i risultati ottenuti dalla combinazione *Saccharomyces* – *Torulaspora.*

Fenomeni di antibiosi si sono verficati soltanto nella coppia *Mycotorula* – *Torulaspora.*

Da quanto schematicamente è stato fissato emerge adunque la favorevole azione nei processi fermentativi del mosto di *Torulaspora Rosei* una volta che sia associata a *Sacch. ellipsoideus.*

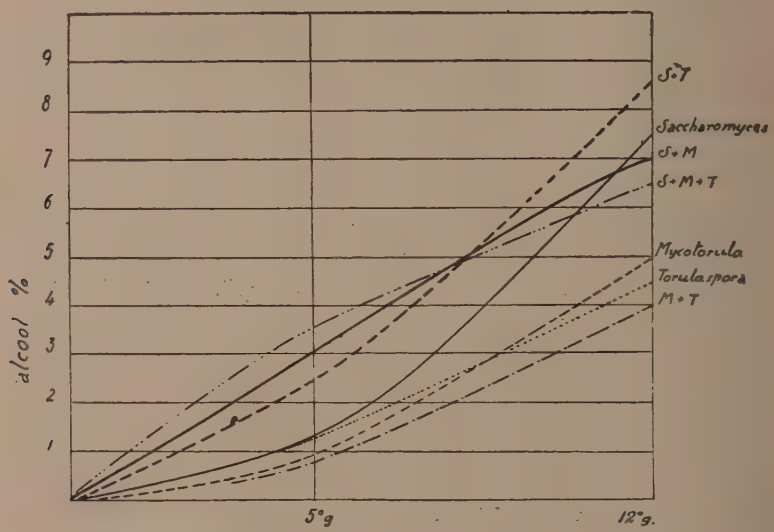

Fig. 29 – *Produzione di alcool, al 5° e 12° g. per opera di* Sacch. ellipsoideus, Torulaspora Rosei, Mycotorula vini, *soli o associati.*

Nei riguardi delle variazione dell' acidità c' è da notare che l'unione delle specie ricordate porta in genere ad un abbassamento dell' acidità totale ed anche fissa mentre tende ad aumentare l' acidità volatile.

Per il secondo gruppo di esperienze fu preso in considerazione il solo lievito ellittico e di questo i ceppi n. 31 - 50 - 60 - 62 - 72. Furono fatti fermentare soli o combinati e sia in mosto sia in una soluzione di saccarosio al 20% in acqua di lievito.

I risultati ottenuti sono consegnati nelle Tabelle annesse.

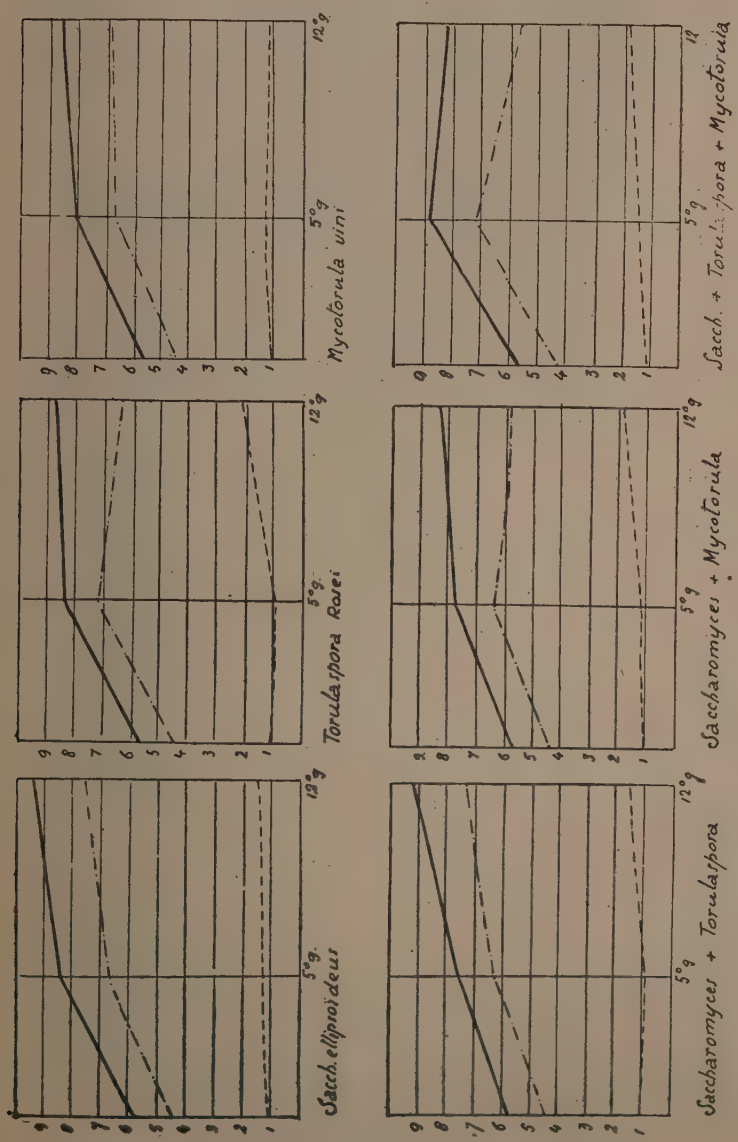

Fig. 30 – *Variazioni dell'acidità nel mosto, al 5° e 12° g., per opera di* Sacch. ellipsoideus, Torulaspora Rosei e Mycotorula vini, *soli o associati.*

TABELLA V – Caratteristiche del *mosto* di partenza

Zuccheri riduttori % 25,775

Ac. totale (ac. tartarico) „ 0,603

Stipiti inoculati e combinazioni	inizio della fermentaz. giorno	ac. totale (ac. tartar.) %	alcool etilico %	media produzione di alcool nelle combinazioni:
31	5°	0.944	13.73	
50	4°	0.986	8.80	
60	5°	0.922	9.60	semplici : 10.70
62	3°	0.901	11.07	
72	3°	0.847	10.33	
31 + 50	3°	0.901	7.87	
31 + 60	4°	0.933	10.27	
31 + 62	6°	0.804	9.07	
31 + 72	4°	0.955	12.13	doppie : 10,14
50 + 60	4°	0.935	8.93	
50 + 62	3°	0.998	10.80	
50 + 72	3°	0.879	9.67	
60 + 62	3°	0.890	9.80	
60 + 72	3°	0.956	10.87	
62 + 72	4°	1.115	12.07	
31 + 50 + 60	3°	0.976	11.67	
31 + 50 + 62	6°	1.083	12.47	
31 + 50 + 72	3°	0.880	8.80	
31 + 60 + 62	3°	0.977	12.53	
31 + 60 + 72	3°	0.977	11.47	
31 + 62 + 72	3°	0.998	11.20	triple : 10,50
50 + 60 + 62	3°	0.977	10.35	
50 + 60 + 72	5°	1.006	8.67	
50 + 62 + 72	3°	0.987	9.27	
60 + 62 + 72	3°	0.950	9.53	
31 + 50 + 60 + 62	2°	0.968	9.93	
31 + 50 + 60 + 72	2°	0.987	11.27	
31 + 50 + 62 + 72	2°	0.940	11.33	quadruple: 10.82
31 + 60 + 62 + 72	2°	1.015	9.33	
50 + 60 + 62 + 72	2°	0.977	12.27	
31 + 50 + 60 + 62 + 72	3°	0.996	10.87	quintuple : 10.87

TABELLA VI – Caratteristiche del liquido di partenza costituito da 200 gr. di lievito e 1000 di acqua digerito in autoclave, filtrato e sterilizzato previa aggiunta di saccarosio al 20 %

Titolo zuccherino 20 %
Ac. totale % (ac. tartarico) 0.297

Stipiti inoculati e combinazioni	inizio della fermentaz. giorno	ac. totale (ac. tartar.) %	alcool etilico %	media produzione di alcool nelle combinazioni
31	4°	0.387	9.14	
50	3°	0.484	8.94	
60	3°	0.371	8.87	semplici : 8.82
62	4°	0.337	8.80	
72	4°	0.484	8.33	
31 + 50	3°	0.416	9.33	
31 + 60	3°	0.427	9.14	
31 + 62	3°	0.343	9.20	
31 + 72	3°	0.418	9.33	doppie : 9.29
50 + 60	3°	0.375	9.87	
50 + 62	3°	0.375	9.07	
50 + 72	3°	0.450	9.07	
60 + 62	3°	0.312	9.33	
60 + 72	2°	0.397	9.20	
62 + 72	3°	0.397	9.33	
31 + 50 + 60	3°	0.300	9.53	
31 + 50 + 62	2°	0.407	9.53	
31 + 50 + 72	3°	0.461	9.60	
31 + 60 + 62	3°	0.386	9.60	
31 + 60 + 72	2°	0.375	9.74	
31 + 62 + 72	2°	0.257	9.67	triple : 9.73
50 + 60 + 62	2°	0.375	9.67	
50 + 60 + 72	2°	0.407	9.94	
50 + 62 + 72	2°	0.354	10 —	
60 + 62 + 72	2°	0.365	10 —	
31 + 50 + 60 + 62	2°	0.343	9.67	
31 + 50 + 60 + 72	2°	0.354	9.57	
31 + 50 + 62 + 72	2°	0.318	10.06	quadruple : 9.84
31 + 60 + 62 + 72	2°	0.279	9.74	
50 + 60 + 62 + 72	2°	0.365	9.68	
31 + 50 + 60 + 62 + 72	2°	0.407	10 —	quintuple : 10.—

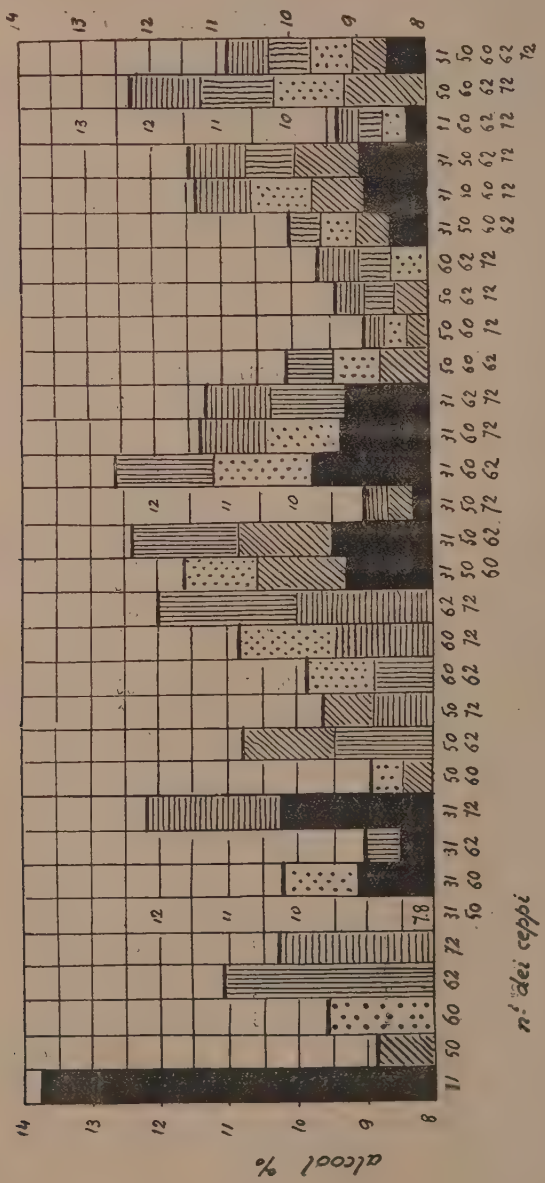

Fig. 31 — *Quantità di alcool nei mosti fermentati da una o più razze.*

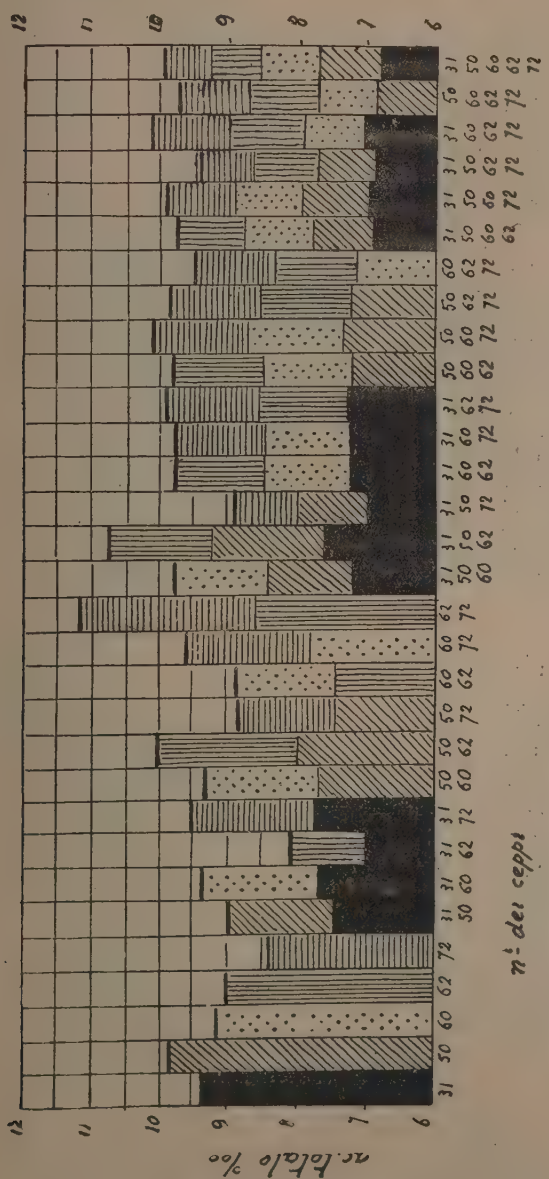

Fig. 32. – *Quantità di acidi totali (espressi in ac. tartarico) in mosti fermentati da una o più razze.*

È risultato, adunque, che i lieviti sperimentati presentano una diversa attività; attività che si manifesta sia con diverso rendimento alcoolico che con diversa produzione di acido.

I risultati conseguiti attraverso le diverse combinazioni i quali appaiono

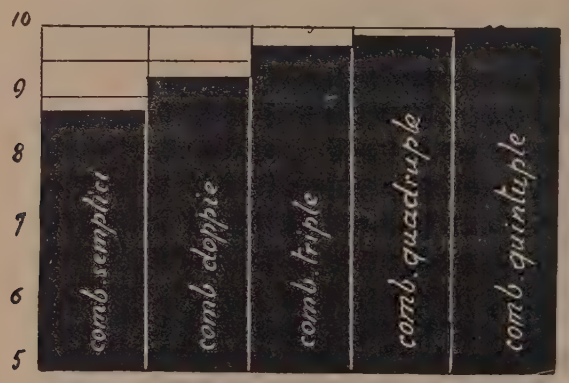

Fig. 33 – *Media produzione di alcool da saccarosio nelle diverse combinazioni.*

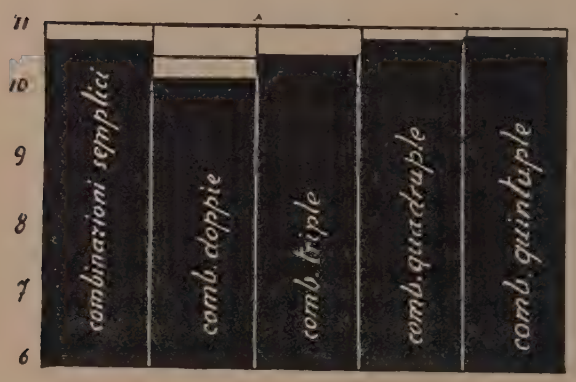

Fig. 34 – *Media produzione di alcool da mosto, nelle diverse combinazioni.*

dalla Tab. V e dal grafico di fig. 31 indicano che il rendimento alcoolico dei

mosti viene notevolmente influenzato, ora in senso positivo, ora negativo, dalla presenza combinata di due o più ceppi. Non diversamente, sebbene con minore evidenza, i fatti si svolgono nella fermentazione del saccarosio.

Considerazioni analoghe valgono anche (v. Tabelle e grafico di fig. 32) per quanto ha riferimento all'acidità; ed esemplificare con dettaglio, sia nei riguardi del rendimento alcoolico che della produzione di acido, non è il caso, più interessante apparendoci di fissare la seguente conclusione.

E, cioè, se l'unione di più specie di lieviti o di più razze di ellittico porta ad un diverso rendimento alcoolico e ad un diverso titolo acido dei mosti fermentati, sarà necessario ai fini pratici e allo scopo di ottenere prodotti aventi migliori requisiti, di procedere alla fermentazione del mosto con quelle combinazioni di specie o di razze che un preliminare studio indichi come più opportune al conseguimento dello scopo prefisso.

8 - CONCLUSIONI

Studiando, dal punto di vista microbiologico, uve e vini della regione di Macerata sono stati isolati n° 82 ceppi. La maggior parte di questi sono risultati appartenere a *Sacch. ellipsoideus* HANSEN: di questa specie si sono fissati alcuni caratteri differenziali tra i diversi stipiti. Oltre al lievito ellittico sono state isolate, con notevole minore frequenza, le seguenti specie delle quali alcune non ancora segnalate o descritte: *Mycoderma cerevisiae* DESM., *Pichia membranaefaciens* HANSEN, *Pichia (Zygopichia?) uvarum* n. sp., *Torulopsis uvae* (POLL. et NANN.) LODDER, *Turulopsis minor* (POLL. et NANN.) LODDER, *Torulopsis carnescens* n. sp., *Torulopsis pulcherrima* (LINDNER) SACC., *Torulopsis* sp., *Kloeckeraspora uvarum* NIEHAUS, *Kloeckera apiculata* (REESS) JANKE, *Sacch. Mangini* GUILL., *Zygosaccharomyces* sp. (n. sp.?), *Torulaspora Rosei* GUILL., *Mycotorula vini* n. sp.

Con *Kloeckeraspora uvarum* sono state eseguite particolari prove onde chiarire alcuni fatti relativi alla sporulazione.

Delle nuove specie sono stati fissati con qualche dettaglio i caratteri diagnostici.

In confronto con i vicini mosti umbri studiati da De Rossi e Castelli è risultata una minore percentuale dei lieviti apiculati non rinvenendosi *Kloeckera magna*. Per contro, sono state rinvenute, come in quelli, *Torulaspora Rosei* e *Torulopsis pulcherrima*.

Vennero eseguite particolari ricerche sul comportamento delle diverse specie e dei vari stipiti di fronte a quantità variabili di alcool etilico e di acido tartarico.

Infine, si è eseguita la fermentazione del mosto con *Sacch. ellipsoideus* unito o non a *Torulaspora Rosei* e *Mycotorula vini* e con una o più razze di *Sacch. ellipsoideus*, pervenendo a risultati tali da giustificare l'ipotesi che la fermentazione integrale del mosto non possa compiersi per opera di una sola specie o razza.

Facoltà di Agraria della R. Università
Istituto di Patologia Vegetale e Microbiologia Agraria

(Presentata il 21 giugno 1936 - XIV)

NOTE CITATE

(1) – G. De Rossi – *I lieviti della fermentazione vinaria nella regione umbra.* – Rel. al IV Congr. int. della vigna e del vino – Losanna, 1935.

(2) – R. Perotti e O. Verona – *Carta descrittiva per i Lieviti.* – Nuovo Giorn. Bot. It. v. XLII, p. 438, 1935.

(3) – O. Verona e M. Valleggi – *Blastomiceti delle frutta* – Boll. R. Ist. Sup. Agrario di Pisa, v. IX, 1933.

(4) – O. Verona – *Fermenti selezionati od associazione di più razze nella vinificazione?* – ibidem, 1933.

(5) – N. M. Stelling-Dekker – *Die sporogenen Hefen.* – Amsterdam, 1931.

(6) – T. Castelli – *Su alcuni blastomiceti dei mosti umbri.* – Boll. dell'Ist. Sierot. milanese, 1935.

(7) – J. Lodder – *Die anaskosporogenen Hefen.* – Amsterdam, 1934.

(8) – T. Castelli – *Sur la sporulation du Pseudosaccharomyces apiculatus.* – Boll. della Sez. Ital. della Soc. Int. di Microbiologia. fasc. IV, 1935.

(9) – I. G. Niehaus – *Untersuchungen über Apiculatushefen* – Centr. f. Bakt. II Abt., v. 87, 1932.

(10) – R. Ciferri e P. Redaelli – *Contribuzioni alla sistematica delle Torulopsidaceae.* – Arch. f. Mikr. 6, 9, 1935.

(11) – O. Verona – *Su di una bevanda tipo "Joghurt" dell' isola di Giava e sulle associazioni microbiche nella fermentazione acido-alcoolica del latte.* Boll. R. Istituto Super. Agrario di Pisa, 1933.

(12) – G. De Rossi – *I lieviti apiculati nella fermentazione vinaria.* – Star. Sperim. Agr. Italiane, v. 53, 1920.